

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**



**APOPTOSE INDUZIDA POR DIFERENTES TIPOS DE VIRUS**  
**INFLUENZA**

**Luis André Cruz dos Santos**

**Orientadores:** Professora Doutora Helena Paula Lopes Henriques Rebelo de Andrade  
Professora Doutora Cecília Maria Pereira Rodrigues

Tese especialmente elaborada para a obtenção do grau de Doutor em Farmácia,  
especialidade Biologia Celular e Molecular.

**2018**



**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**



**APOPTOSE INDUZIDA POR DIFERENTES TIPOS DE VIRUS**  
**INFLUENZA**

**Luis André Cruz dos Santos**

**Orientadores:** Professora Doutora Helena Paula Lopes Henriques Rebelo de Andrade  
Professora Doutora Cecília Maria Pereira Rodrigues

Tese especialmente elaborada para a obtenção do grau de Doutor em Farmácia, especialidade  
Biologia Celular e Molecular.

Júri:

Presidente: Doutora Matilde da Luz Santos Duque da Fonseca e Castro, Professora Catedrática e  
Directora da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Vogais: - Doutor Paulo Jorge Pereira Cruz Paixão, Professor Auxiliar  
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa;  
- Doutora Perpétua da Conceição Rodrigues Gomes Cavaco Silva, Professora Associada  
Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz;  
- Doutor José António Frazão Moniz Pereira, Professor Catedrático  
Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa;  
- Doutor José Miguel Azevedo Pereira, Professor Auxiliar com Agregação  
Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa;  
- Doutora Helena Paula Lopes Henriques Rebelo de Andrade, Professora Auxiliar Convidada  
Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

O autor da tese teve apoio financeiro da Fundação para a Ciência e Tecnologia através da bolsa de  
Doutoramento SFHR/BD/62676/2009 e do projecto de investigação PTDC/SAU-MIC/122780/2010.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco



Esta dissertação apresenta-se escrita em língua portuguesa sem o novo acordo ortográfico

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

# Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas e instituições que tornaram possível a execução do trabalho apresentado nesta dissertação:

à minha orientadora, Professora Doutora Helena Rebelo de Andrade, que me acolheu há 10 anos na sua equipa de investigação contribuindo ao longo deste tempo com a sua experiência e o seu conhecimento para o meu contínuo crescimento científico. Por me ter apresentado e acreditado na linha de investigação abraçada nesta dissertação e por ter feito todos os possíveis para arranjar condições humanas e financeiras para que a mesma fosse concluída com êxito;

à minha co-orientadora, Professora Doutora Cecília Rodrigues, e toda a sua equipa por me ter transmitido muito do conhecimento adquirido na área da apoptose, por me ter acolhido e dado condições para realizar alguns dos ensaios descritos nesta dissertação e, principalmente, pela sua capacidade tranquilizadora transmitida em todas as reuniões de actualização;

ao Departamento de Doenças Infecciosas e Departamento de Genética do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, à antiga Unidade de Retrovírus e Infecções Associadas (URIA) e ao antigo Centro de Patogénese Molecular (CPM) actualmente incluídos no instituto de Investigação do Medicamento (iMed) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, que contribuíram para a execução dos trabalhos práticos realizados nesta dissertação através da disponibilização das infra-estruturas, de reagentes e de material biológico necessários à realização deste trabalho;

às instituições que contribuíram para o financiamento deste trabalho, a Fundação para a Ciência e Tecnologia pelo financiamento da bolsa de doutoramento SFRH/BD/62676/2009 e do projecto de investigação PTDC/SAU-MIC/122780/2010, a Fundação Calouste Gulbenkian e o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge;

a todos que os que partilharam os seus conhecimentos que serviram de base para o desenvolvimento deste trabalho, nomeadamente a Carla Roque na área da cultura de tecidos, a Anabela Coelho no isolamento dos vírus influenza, o Paulo Gonçalves na área da biologia molecular

ligada aos PCRs, a Marta Gíria na área da biologia molecular ligada à clonagem, a Sónia Pedro na área da sequenciação de DNA e a Susana Sola na área da avaliação da apoptose;

a toda a Unidade de Inovação e Tecnologia do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge por ter realizado as corridas de electroforese de capilares e a primeira análise das sequências obtidas, em particular à Catarina Silva pelo contínuo feedback e discussão sobre a qualidade das sequências obtidas;

aos meus colegas de laboratório que me acompanharam neste longo período, João, Marta e Vanessa quero agradecer-vos pelas conversas científicas e menos científicas, aos desvãos e companhia nas longas noites de trabalho e por me fazerem perceber o sentido da frase “a união faz a força”.

Aos meus amigos Anabela, Íris, Sónia, Patrícia e Paulo pela companhia diária e se tornarem uma segunda família que sempre me apoiou e deu força para levar este trabalho até ao fim; Lúcia, Margarida e Nuno que apesar da distância, física e temporal, sinto o vosso apoio como se tivéssemos sempre juntos; Adérito, António, David, Joana, Jorge, Nuno, Patrícia, Sara e Sílvia, “família cigana” sempre pronta para uma festança de convívio onde nos esquecemos dos problemas e celebramos a amizade.

Ao Paulo por todo o incentivo, apoio e compreensão, mesmo durante as ausências nas longas noites de trabalho.

Ao Aniceto, Indy e Kiny por me trazerem a paz de espírito essencial para terminar esta fase tão importante da minha vida.

Por último e não menos importante à minha família, mãe, pai, Rita, primas e tias por todas as bases e apoio que me deram para ser a pessoa que sou hoje, o que permitiu levar até ao fim mais esta etapa da minha vida.

**Muito Obrigado a todos!!!**

# Resumo

A gripe é uma doença provocada pelo vírus influenza, anualmente responsável por provocar epidemias sazonais com elevadas taxas de morbilidade e mortalidade. O vírus influenza tem a capacidade de interagir com mecanismos celulares do hospedeiro de modo a tornar mais eficiente o seu ciclo replicativo. Um dos mecanismos estudados, nos vírus influenza do tipo A, nos últimos anos, é a morte celular por apoptose. No entanto, os vírus influenza do tipo B não foram incluídos na maioria destes estudos, deixando uma lacuna no conhecimento nesta temática.

Neste estudo, foram seleccionadas, por caracterização genética, duas estirpes representativas de vírus influenza do tipo A e do tipo B, depois utilizadas na infecção de células MDCK-SIAT1 no estudo da apoptose, através de ensaios de libertação da enzima lactato desidrogenase, coloração de Hoechst, actividade das caspases, análise de expressão de proteínas e transfecção de genes virais. Os resultados obtidos apontam para uma diferença nos perfis de indução da apoptose entre a infecção com vírus influenza do tipo A e do tipo B. Enquanto os vírus influenza do tipo A induzem a apoptose numa fase tardia da infecção, maioritariamente pela via intrínseca, os vírus influenza do tipo B induzem a apoptose numa fase inicial da infecção, recrutando as vias intrínseca e extrínseca. Os resultados revelaram, a nível celular, a via do I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B, e a nível viral, os genes M e NS na inibição da apoptose nos vírus influenza do tipo A bem como os genes PB2, PB1 e PA na indução da apoptose nos vírus influenza do tipo B, como possíveis responsáveis das diferenças observadas no perfil de apoptose.

A compreensão das interacções vírus-hospedeiro é essencial, nos vírus influenza do tipo A e nos do tipo B, pois permite a identificação de componentes virais e/ou celulares que afectam a replicação viral e podem ser utilizados no estudo de novos alvos terapêuticos.

## Palavras-chave

Vírus influenza A e B; A(H1N1)pdm09; Indução/inibição da apoptose; NF- $\kappa$ B; PI3K/Akt

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

# Abstract

Annual influenza epidemics are associated with high morbidity and mortality rates. For successful replication, influenza viruses have evolved as to counteract and/or take a part on host defense mechanisms. Manipulation of apoptosis is one of such mechanisms that have been subject of attention, particularly in relation to influenza type A viruses over the past years. However, this knowledge has not been extended to include influenza type B viruses.

In this study, were selected, by genetic characterization, two representative strains of influenza type A and type B virus that were used to infect MDCK-SIAT1 cells and study the apoptosis, through lactate dehydrogenase measurements, Hoechst dye staining, caspase activity assays, protein expression analysis and viral gene transfection.

The resulting data point to a difference in induction of apoptosis profiles between influenza type A and type B viruses. While influenza type A virus induced apoptosis later in the course of infection and mainly by the intrinsic pathway, influenza type B virus induced apoptosis early in infection by both intrinsic and extrinsic pathways. Also, data revealed, in the cell, the I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B pathway, and, in the virus, the genes M and NS (influenza type A virus apoptosis inhibition), and the gene PB2, PB1 and PA (influenza type B virus apoptosis induction), as the major contributors for the observed differences.

The study of the virus-host interactions, particularly those that could have an impact on viral replication, are essential in both influenza type A and type B viruses, as they will allow the identification of viral and/or host targets common to both influenza types, which could affect viral replication. This information may prove useful for vaccine and antiviral research.

# Keywords

Influenza A and B virus; A(H1N1)pdm09; apoptosis induction/inhibition; NF- $\kappa$ B; PI3K/Akt

Esta página foi intencionalmente deixada em branco



# Estrutura da tese

A presente dissertação encontra-se dividida em sete capítulos principais. No primeiro capítulo é feita uma revisão da literatura referente às características dos vírus influenza e à interacção dos vírus influenza com as células infectadas, nomeadamente os mecanismos que o vírus manipula e/ou com os quais interfere provocando a indução e/ou inibição da apoptose. No Capítulo 2 é apresentada a hipótese deste trabalho, formulada de acordo com os factos expostos na revisão da literatura, assim como os objectivos gerais e específicos estabelecidos para este trabalho.

A componente científica desta tese foi dividida em três capítulos principais, em que no Capítulo 3 se descreve a caracterização genética de estirpes da nova variante pandémica de vírus influenza A(H1N1)pdm09, circulantes em Portugal, desde a implementação e aferição das metodologias de sequenciação do genoma da variante pandémica A(H1N1)pdm09, até aos resultados obtidos durante esta implementação/aferição. No Capítulo 4 encontra-se descrito o desenvolvimento experimental para preparar todo o material biológico necessário para os estudos descritos no Capítulo 5, desde a cultura celular, à constituição dos stocks virais, e à implementação e adaptação de metodologias de titulação de vírus influenza e de um protocolo de clonagem dos segmentos virais dos vírus influenza do tipo A e do tipo B num plasmídeo bidireccional de expressão. No Capítulo 5 é descrito o estudo da indução/inibição da apoptose na infecção por vírus influenza do tipo A e do tipo B. Este capítulo encontra-se dividido em metodologias aplicadas, resultados e discussão, onde numa primeira fase foram estudadas as diferenças na cinética da apoptose na infecção com vírus influenza do tipo A e do tipo B e, numa segunda fase, foram estudadas as vias celulares que poderão justificar as diferenças detectadas na primeira fase. Por fim, numa terceira fase, foi estudado o efeito de cada segmento genético viral na indução/inibição da apoptose.

No Capítulo 6 são resumidos os principais achados deste trabalho sob a forma de considerações finais.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

# Abreviaturas

<b>Akt</b>	proteína cinase B
<b>Apaf-1</b>	protéase de activação da apoptose 1
<b>BPB</b>	azul de bromofenol
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>CO<sub>2</sub></b>	dióxido de carbono
<b>CT</b>	cultura de tecidos
<b>DMEM</b>	meio Eagle modificado, fórmula Dulbecco's
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>dNTPs</b>	desoxinucleótidos fosfatados
<b>DPBS</b>	tampão fosfato salino, fórmula Dulbecco
<b>DTT</b>	ditiotreitól
<b>EDTA</b>	ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FBS</b>	soro de feto de bovino
<b>GFP</b>	<i>green fluorescent protein</i>
<b>GISAID</b>	<i>Global Initiative on Sharing All Influenza Data</i>
<b>HA</b>	hemaglutinina
<b>HA0</b>	forma precursora da hemaglutinina
<b>HA1</b>	subunidade 1 da hemaglutinina
<b>HA2</b>	subunidade 2 da hemaglutinina
<b>HEPES</b>	ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il)-etanossulfónico
<b>hpi</b>	horas pós-infecção
<b>Hsp70</b>	<i>heat-shock protein 70</i>
<b>IAPs</b>	proteínas inibidoras da apoptose
<b>ICTV</b>	International Committee on Taxonomy of Viruses
<b>INSA</b>	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP
<b>IκB</b>	inibidor do NF-κB

<b>IKK</b>	I $\kappa$ B cinase
<b>LB</b>	meio Luria-Bertani
<b>LDH</b>	enzima lactato desidrogenase
<b>M1</b>	matriz
<b>M2</b>	canal iónico
<b>MAPK</b>	proteíno-cinases activadas por mitógenos
<b>MAVS</b>	<i>mitochondrial antiviral signaling</i>
<b>MDCK</b>	linha celular <i>Madin-Darby canine kidney</i>
<b>MDCK-SIAT1</b>	linha celular MDCK transfectada com o gene humano <i>CMP-Nacetylneuraminate beta-galactoside <math>\alpha</math>-2,6-sialyltransferase</i>
<b>MOI</b>	<i>multiplicity of infection</i>
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>NA</b>	neuraminidase
<b>NAD</b>	dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado
<b>NADH</b>	dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
<b>NEP</b>	<i>nuclear export protein</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	factor nuclear $\kappa$ B
<b>NLS</b>	<i>nuclear localization signal</i>
<b>NP</b>	nucleoproteína
<b>NS1</b>	proteína não estrutural 1
<b>NS1A</b>	proteína não estrutural 1 dos vírus influenza do tipo A
<b>NS1B</b>	proteína não estrutural 1 dos vírus influenza do tipo B
<b>oePCR</b>	<i>overlap extension PCR</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>ORF</b>	<i>open reading frame</i>
<b>PA</b>	polimerase ácida
<b>pb</b>	pares de bases
<b>PB1</b>	polimerase base 1
<b>PB2</b>	polimerase base 2
<b>PCR</b>	reacção em cadeia da polimerase

<b>PFU</b>	<i>plaque form unit</i>
<b>PHE</b>	<i>Public Health England</i>
<b>PI3K</b>	fosfatidilinositol 3-cinase
<b>PKC</b>	proteína cinase C
<b>PKR</b>	proteína cinase R
<b>PSN</b>	penicilina, estreptomicina e neomicina
<b>RNA</b>	ácido ribonucleico
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>RT-PCR</b>	reacção em cadeia da polimerase com passo de transcrição reversa
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sódio
<b>TAE</b>	tampão Tris-Acetato-EDTA
<b>TBE</b>	tampão Tris-Borato-EDTA
<b>TBS</b>	tampão Tris salino
<b>TCID<sub>50</sub></b>	<i>tissue culture infectious dose 50</i>
<b>Tripsina-TPCK</b>	tripsina tratada com tosil fenilalanina clorometil cetona
<b>UTI-INSA</b>	Unidade de Tecnologia e Inovação do Departamento de Genética do INSA
<b>vRNA</b>	RNA viral
<b>vRNP</b>	complexos de ribonucleoproteínas virais
<b>XIAP</b>	proteína inibidora da apoptose ligada ao cromossoma X

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

# Lista de publicações

Os resultados obtidos neste trabalho, assim como o material biológico produzido e as metodologias implementadas e optimizadas contribuíram para:

– Publicações em revistas internacionais com arbitragem:

- Gíria M, **Santos L**, Louro J, Rebelo de Andrade H. *Reverse genetics vaccine seeds for influenza: Proof of concept in the source of PB1 as a determinant factor in virus growth and antigen yield*. Virology, 2016. 496:21-7;
- **Santos LA**, Sola S, Rodrigues CM, Rebelo-de-Andrade H. *Distinct kinetics and pathways of apoptosis in influenza A and B virus infection*. Virus Res, 2015. 205: 33-40;
- Correia V, **Santos LA**, Gíria M, Almeida-Santos MM, Rebelo-de-Andrade H. *Influenza A(H1N1)pdm09 resistance and cross-decreased susceptibility to oseltamivir and zanamivir antiviral drugs*. J Med Virol, 2015. 87: 45-56;
- Gíria MT, Rebelo de Andrade H, **Santos LA**, Correia VM, Pedro SV, Santos MA. *Genomic signatures and antiviral drug susceptibility profile of A(H1N1)pdm09*. J Clin Virol, 2012. 53: 140-144;
- **Santos LA**, Correia V, Gíria M, Pedro S, Santos MM, Silvestre MJ, Rebelo-de-Andrade H. *Genetic and antiviral drug susceptibility profiles of pandemic A(H1N1)v influenza virus circulating in Portugal*. Influenza Other Respir Viruses, 2011. 5 (Suppl. 1), 294–300;

– Publicações em revistas nacionais com arbitragem:

- **Santos LA**, Correia V, Pedro S, Alverca E, Santos MM, Silvestre MJ, Rebelo-de-Andrade H. *Caracterização genética da nova variante pandémica do vírus influenza A(H1N1) 2009 em circulação em Portugal: resultados preliminares*. Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas, 2010. 6(1): 7-13;

Esta página foi intencionalmente deixada em branco



# Índice

<b>Agradecimentos .....</b>	<b>v</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>vii</b>
<b>Palavras-chave .....</b>	<b>vii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>ix</b>
<b>Keywords .....</b>	<b>ix</b>
<b>Estrutura da tese .....</b>	<b>xi</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>xiii</b>
<b>Lista de publicações .....</b>	<b>xvii</b>
<b>Índice .....</b>	<b>xix</b>
<b>Índice de figuras .....</b>	<b>xxiii</b>
<b>Índice de tabelas.....</b>	<b>xxvii</b>
<b>1 Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1 Classificação dos vírus influenza .....	3
1.2 Variação genética, <i>shift</i> e <i>drift</i> antigénicos .....	4
1.3 Gripe sazonal e pandémica .....	5
1.3.1 Pandemia A(H1N1)pdm09 .....	7
1.4 Estrutura, genoma e proteínas .....	7
1.5 Ciclo replicativo .....	12
1.6 Interações vírus/hospedeiro: vírus influenza e a apoptose .....	15
1.6.1 Apoptose.....	15
1.6.2 Controlo da apoptose pela NS1.....	17
1.6.3 Indução da apoptose pela PB1-F2 .....	18
1.6.4 Outras proteínas virais que influenciam a apoptose celular .....	19
<b>2 Hipótese de trabalho e objectivos .....</b>	<b>21</b>
2.1 Hipótese de trabalho .....	23
2.2 Objectivos .....	23
2.2.1 Objectivo geral .....	24
2.2.2 Objectivos específicos.....	24
2.3 Desenvolvimento experimental previsto .....	24
<b>3 Caracterização genética dos vírus A(H1N1)pdm09 circulantes em Portugal.....</b>	<b>27</b>
3.1 Resumo.....	29
3.2 Implementação e aferição de um protocolo de sequenciação genómica para os vírus da variante pandémica A(H1N1)pdm09.....	29
3.2.1 Optimização dos primers.....	30

3.2.2 Implementação do protocolo .....	31
3.2.3 Análise das sequências.....	33
3.2.4 Optimização do protocolo de sequenciação .....	36
3.3 Sequenciação dos genes das glicoproteínas de superfície e da proteína não estrutural NS1...	37
3.4 Sequenciação do genoma completo.....	39
<b>4 Desenvolvimento experimental conducente ao estudo da apoptose nos vírus influenza.....</b>	<b>41</b>
4.1 Resumo.....	43
4.2 Selecção de estirpes.....	43
4.3 Preparação de stocks virais .....	45
4.3.1 Cultura Celular .....	45
4.3.1.1 Células MDCK-SIAT1 .....	46
4.3.1.2 Células 293T.....	49
4.3.1.3 Preparação de células para recuperação de partículas virais a partir de plasmídeos ..	50
4.3.2 Isolamento dos stocks virais .....	51
4.3.2.1 Reacção de hemaglutinação .....	52
4.3.3 Sequenciação dos stocks virais .....	54
4.3.3.1 Sequenciação do genoma do stock viral do tipo B.....	54
4.4 Titulação dos stocks virais .....	57
4.4.1 Titulação das unidades formadoras de placas (PFU) .....	57
4.4.1.1 Cálculo de PFU segundo a abordagem descrita por Matrosovich <i>et al.</i> .....	58
4.4.1.2 Cálculo de PFU segundo a abordagem descrita por Cooper <i>et al.</i> .....	60
4.4.2 Titulação da dose infecciosa em cultura celular (TCID <sub>50</sub> ) .....	61
4.5 Construção da biblioteca de genes.....	64
4.5.1 Segmentos genéticos M, NS e gene GFP .....	64
4.5.1.1 Amplificação do segmento genético .....	65
4.5.1.2 Digestão e ligação do segmento genético ao plasmídeo .....	67
4.5.1.3 Transformação de células quimicamente competentes .....	68
4.5.1.4 PCR <i>Colony</i> .....	69
4.5.1.5 Confirmação da inserção do segmento genético no plasmídeo.....	71
4.5.1.6 Confirmação da sequência nucleotídica do segmento genético inserido no <i>pCIPolISapIT</i> .....	72
4.5.1.7 Constituição de stocks dos genes clonados.....	73
4.5.2 Amplificação dos segmentos genéticos grandes por oePCR .....	74
4.5.3 Clonagem dos segmentos genéticos grandes com zona(s) de restrição da enzima <i>SapI</i> ..	76
4.5.4 Recuperação de vírus através dos plasmídeos .....	78
<b>5 Apoptose na infecção por vírus influenza do tipo A e do tipo B .....</b>	<b>81</b>
5.1 Resumo.....	83
5.2 Metodologias aplicadas .....	84
5.2.1 Infecção de células MDCK-SIAT1 com os vírus stock .....	84
5.2.1.1 Preparação das células .....	84
5.2.1.2 Inoculação dos vírus.....	84
5.2.2 Ensaio de morte celular e apoptose .....	85
5.2.2.1 Libertação da enzima LDH .....	85
5.2.2.2 Morfologia de células em apoptose.....	86
5.2.2.3 Actividade das caspases .....	87
5.2.3 Análise de vias celulares envolvidas na apoptose induzida pelos vírus influenza.....	88

5.2.3.1 Extracção das proteínas .....	88
5.2.3.2 Quantificação das proteínas .....	89
5.2.3.3 Análise das proteínas por <i>immunoblot</i> .....	89
5.2.3.4 Actividade do NF- $\kappa$ B .....	93
5.2.4 Análise das proteínas virais na indução da apoptose .....	94
5.2.4.1 Translocação do NF- $\kappa$ B em células transfectadas com o gene NS1 .....	94
5.2.4.2 Efeito de cada gene viral na indução da apoptose .....	98
5.2.5 Tratamento de resultados e análise estatística .....	100
5.3 Resultados .....	101
5.3.1 Perfil cinético de indução da apoptose na infecção com vírus influenza do tipo A e do tipo B .....	101
5.3.1.1 Morte celular total .....	101
5.3.1.2 Morfologia de células em apoptose .....	101
5.3.1.3 Actividade das caspases .....	103
5.3.2 Vias celulares afectadas pela infecção por vírus influenza .....	105
5.3.2.1 Via do PI3K/Akt .....	105
5.3.2.2 Via de activação do NF- $\kappa$ B .....	107
5.3.2.3 Via de activação da MDM2 e inibição do p53 .....	109
5.3.2.4 Via de activação da FoxO e da pBad .....	110
5.3.2.5 Expressão de genes associados à sobrevivência celular .....	110
5.3.3 Estudo dos componentes virais que influenciam as diferenças na indução da apoptose .....	112
5.3.3.1 Efeito da NS1 na activação do NF- $\kappa$ B .....	112
5.3.3.2 Efeito dos diferentes genes virais na activação/inibição da apoptose .....	115
5.4 Discussão .....	117
5.4.1 Diferenças na indução da apoptose entre vírus influenza A e vírus influenza do tipo B ...	117
5.4.2 Vias celulares envolvidas na indução da apoptose pelos vírus influenza .....	118
5.4.3 Componentes virais implicados na indução da apoptose das células infectadas .....	119
<b>6 Considerações finais .....</b>	<b>123</b>
<b>7 Referências bibliográficas .....</b>	<b>129</b>
<b>8 Anexos .....</b>	<b>141</b>
ANEXO A .....	143
ANEXO B .....	145
ANEXO C .....	147

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

# Índice de figuras

Figura 1 – Representação esquemática dos processos evolutivos dos vírus influenza por <i>Drift</i> e <i>Shift</i> antigénico. ....	5
Figura 2 – Taxa de incidência de síndrome gripal e (sub)tipos de vírus influenza circulantes registados em Portugal entre as épocas de 2007/2008 e 2016/2017. ....	6
Figura 3 – Representação esquemática dos processos de recombinação que deram origem à variante do vírus influenza A(H1N1)pdm09. ....	8
Figura 4 – Representação esquemática da estrutura de um vírus influenza do tipo A. ....	9
Figura 5 – Representação esquemática do ciclo replicativo dos vírus influenza. ....	14
Figura 6 – Representação esquemática das vias de indução da apoptose. ....	16
Figura 7 – Representação esquemática dos factores anti-apoptóticos activados pela via de sobrevivência do PI3K/Akt. ....	18
Figura 8 – Diagrama resumo do objectivo geral e dos objectivos específicos estipulados para este trabalho ....	26
Figura 9 – Árvores filogenéticas do alinhamento das sequências de cada segmento genético da estirpe A/Portugal/02/2009. ....	35
Figura 10 – Representação esquemática da estratégia de sequenciação optimizada para as estirpes da variante pandémica A(H1N1)pdm09. ....	36
Figura 11 – Árvores filogenéticas do alinhamento das sequências dos genes HA, NA e NS1 das estirpes isoladas em Portugal da variante pandémica do vírus A(H1N1)pdm09. ....	38
Figura 12 – Árvore filogenética do alinhamento das sequências da subunidade HA1 do gene da HA das estirpes de vírus influenza do tipo B. ....	45
Figura 13 – Representação esquemática das várias passagens no isolamento do stock viral ....	52
Figura 14 – Representação esquemática da preparação e diluição das amostras na reacção de hemaglutinação. ....	53
Figura 15 – Representação esquemática do princípio da reacção de hemaglutinação. ....	53

Figura 16 – Representação esquemática da estratégia de sequenciação utilizada na sequenciação do controlo de vírus influenza do tipo B. ....	55
Figura 17 – Representação esquemática da distribuição das diluições sucessivas virais a serem tituladas numa placa de 6 poços para o cálculo das PFUs.....	58
Figura 18 – Fotografia de placas com a aplicação da metodologia proposta por Matrosovich <i>et al.</i> , 2006 .....	59
Figura 19 – Exemplo de um poço com placas visíveis e individualizadas, utilizando a abordagem de descrita por Cooper <i>et al.</i> ....	61
Figura 20 – Representação esquemática da distribuição das diluições virais, controlo negativo e respectivos replicados ao longo da placa de 96 poços na titulação por TCID <sub>50</sub> .....	62
Figura 21 – Representação esquemática da digestão e ligação do segmento amplificado ao plasmídeo bidireccional de expressão <i>pCIPolISapIT</i> .....	67
Figura 22 – Exemplo de um gel de electroforese de um PCR <i>Colony</i> . ....	71
Figura 23 – Representação esquemática da estratégia de transcrição e amplificação dos segmentos genéticos virais maiores por oePCR. ....	74
Figura 24 – Gel de electroforese do resultado do oePCR do segmento genético HA da estirpe B/Lisboa/08/2006. ....	76
Figura 25 – Representação esquemática da placa de 96 poços onde se indica a posição de distribuição das células inoculadas com os diferentes vírus, das caspases e do controlo para a medição da actividade das caspases 3/7, 8 e 9.....	88
Figura 26 – Exemplo de uma célula transfectada com o <i>pCIPolISapIT_GFP + pCIPolSat_NS1B</i> sem (A) e com (B) translocação de NF- $\kappa$ B do citoplasma para o núcleo. ....	97
Figura 27 – Representação esquemática da placa de 96 poços utilizada no ensaio de transfecção para a medição da actividade das caspases 3/7 .....	100
Figura 28 – A infecção com os vírus A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006 induz diferentes perfis de morte celular e apoptose.....	102
Figura 29 – A infecção de células MDCK-SIAT1 com os vírus A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006 induz diferentes perfis de actividade das caspases. ....	104
Figura 30 – A infecção com os vírus A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006 induz um perfil inicial de activação da via do Akt semelhante para os dois vírus. ....	106

Figura 31 – Células infectadas com o vírus A/Portugal/82/2009 e células infectadas com o vírus B/Lisboa/08/2006 apresentam diferentes perfis de activação da via do NF-κB.....	108
Figura 32 – Células infectadas com o vírus A/Portugal/82/2009 e células infectadas com o vírus B/Lisboa/08/2006 não apresentaram diferentes perfis de activação da via MDM2/p53. ....	109
Figura 33 – A infecção com o vírus A/Portugal/82/2009 induz a expressão de níveis mais elevados dos genes alvo do NF-κB associados à inibição da apoptose, Bcl-X <sub>L</sub> e XIAP.....	111
Figura 34 – Aferição da co-transfecção do plasmídeo controlo ( <i>pCIPolISapIT</i> ) com o plasmídeo repórter ( <i>pCIPolISapIT_GFP</i> ) em células MDCK-SIAT1.....	113
Figura 35 – Translocação de NF-κB do citoplasma para o núcleo em células transfectadas com o plasmídeo que codifica o gene da proteína NS1A, com o plasmídeo que codifica o gene da proteína NS1B e com o plasmídeo controlo.....	114
Figura 36 – Representação gráfica da inibição/indução da apoptose (actividade das caspases efectoras 3/7) por cada gene do vírus A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006.....	116
Figura 37 – Representação esquemática das vias celulares estudadas. ....	126

Esta página foi intencionalmente deixada em branco



# Índice de tabelas

Tabela I – Características das pandemias que ocorreram no século XX.....	7
Tabela II – Tamanho e proteínas codificadas por cada segmento genético dos vírus influenza. ....	9
Tabela III – Lista de <i>primers</i> utilizados na sequenciação do genoma do vírus A(H1N1)pdm09. ....	32
Tabela IV – Condições da reacção de RT-PCR e de sequenciação cíclica do protocolo de sequenciação da variante A(H1N1)pdm09. ....	33
Tabela V – Mutações detectadas nos genes que codificam as proteínas do restante genoma de 13 estirpes portuguesas. ....	39
Tabela VI – Constituição dos diferentes meios utilizados na cultura celular. ....	47
Tabela VII – Condições de crescimento celular para cada tipo de recipiente de cultura utilizado para infecção. ....	49
Tabela VIII - Lista de primers utilizados na sequenciação do genoma de vírus influenza do tipo B. ....	56
Tabela IX – Condições da reacção de RT-PCR e de sequenciação cíclica utilizadas no protocolo de sequenciação do genoma completo do controlo de vírus influenza do tipo B. ....	56
Tabela X – Exemplo dos valores obtidos e respectivo cálculo do TCID <sub>50</sub> . ....	63
Tabela XI – Titulação dos stocks virais com as duas metodologias testadas. ....	63
Tabela XII – Condições da reacção de RT-PCR utilizadas na amplificação dos segmentos genéticos completos do vírus influenza do tipo A e do tipo B. ....	65
Tabela XIII – Primers utilizados para a amplificação dos segmentos genéticos completos do vírus influenza do tipo A e do tipo B. ....	65
Tabela XIV – Condições da reacção de PCR <i>Colony</i> utilizado para detectar as colónias sem segmento genético inserido no plasmídeo. ....	70
Tabela XV – Tamanho previsto dos fragmentos (pb) da digestão com a enzima de restrição <i>XbaI</i> ...	72
Tabela XVI – Composição da mistura de reacção de sequenciação cíclica utilizada na sequenciação dos clones e respectivas condições de reacção. ....	73
Tabela XVII – Tabela de primers utilizados para a amplificação de cada fragmento utilizado no oePCR, para cada segmento viral. ....	75

Tabela XVIII – Composição da mistura de reacção de oePCR utilizada na amplificação dos segmentos virais maiores e respectivas condições de reacção .....	75
Tabela XIX - Formulação dos reagentes e quantidades utilizadas em cada gel de poliacrilamida.....	90
Tabela XX – Propriedades e condições de revelação e detecção de cada anticorpo primário utilizado .....	92
Tabela XXI – Resumo dos plasmídeos utilizados na transfecção das células para o estudo da inibição/indução da actividade das caspases 3/7 .....	98

# **1 Introdução**

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

O vírus influenza é o agente etiológico da gripe. A gripe é uma doença respiratória com padrão sazonal e estima-se que anualmente infecte cerca de 15% da população mundial provocando entre 250 000 e 500 000 mortes anuais. Em Portugal, esta doença ocorre maioritariamente nos meses de inverno. Ocasionalmente, poderá ocorrer na forma pandémica sem sazonalidade definida [1, 2].

### 1.1 Classificação dos vírus influenza

Os vírus influenza pertencem à família *Orthomyxoviridae* que inclui todos os vírus com invólucro lipídico e genoma segmentado de RNA de cadeia simples com polaridade negativa. Esta família é constituída por 7 géneros, *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Influenzavirus D*, *Thogotovirus*, *Isavirus* e *Quaranjavirus* [3-5].

Os vírus influenza do tipo A (do género *Influenzavirus A*) têm a capacidade de infectar o Homem, vários mamíferos e aves domésticas e selvagens; os vírus influenza do tipo B (*Influenzavirus B*) infectam predominantemente o Homem; e os vírus influenza do tipo C (do género *Influenzavirus C*) infectam canídeos, suínos e o Homem originando infecções assintomáticas ou doença ligeira. Os vírus influenza do tipo D (do género *Influenzavirus D*) foram classificados em 2017 pelo ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) como pertencentes a um novo género, tendo já sido detectados em suínos, ovinos, bovinos e caprinos e pensa-se que tenham os bovinos como reservatório natural [5].

Os vírus influenza do tipo A são ainda classificados em subtipos de acordo com a composição das suas glicoproteínas de superfície, a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA), tomando a nomenclatura de acordo com o grupo das glicoproteínas que apresentam. Até à data encontram-se descritos 18 subgrupos de hemaglutininas (da H1 à H18) e 11 subgrupos de neuraminidasas (da N1 à N11). Apesar de, em teoria, ser possível uma infinidade de combinações entre as duas glicoproteínas, só um número limitado de combinações foi detectado em vírus circulantes na natureza, e destes um número ainda menor tem a capacidade de infectar o Homem. Relativamente aos vírus influenza do tipo A, actualmente apenas os subtipos A(H1N1) e A(H3N2) infectam sazonalmente o Homem [6].

Embora os vírus influenza do tipo B não se encontrem divididos em subtipos, existem duas linhagens bem definidas destes vírus em circulação na população humana, a linhagem B/Yamagata e a linhagem B/Victoria.

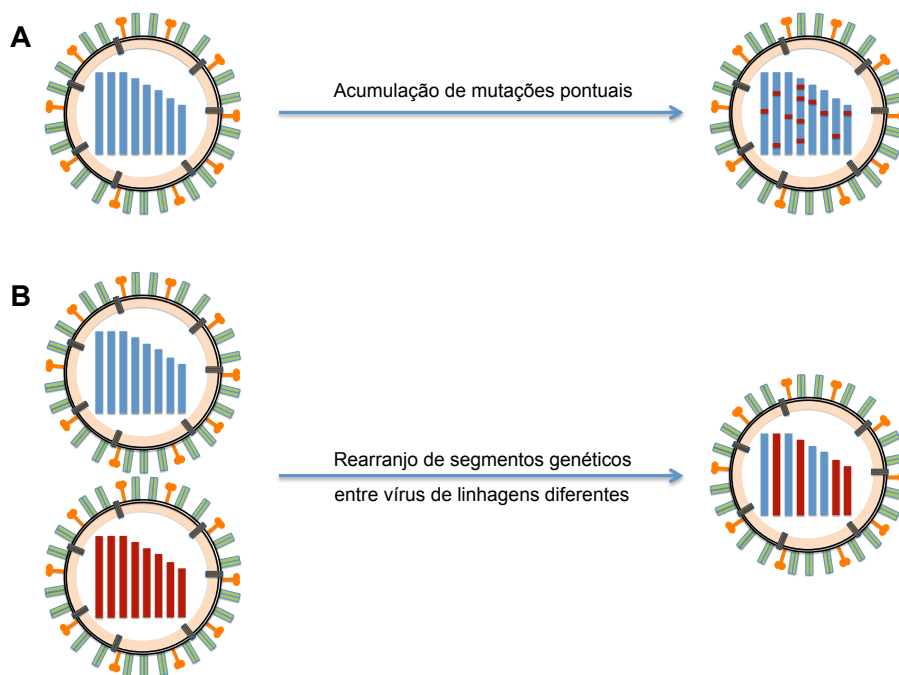
Para cada estirpe de vírus influenza isolada, a organização mundial de saúde (OMS) propõe uma nomenclatura constituída pelo tipo de vírus influenza, seguido do hospedeiro de origem (quando diferente do Homem), a origem geográfica, o número de isolamento, o ano de isolamento e por fim, no caso dos vírus influenza do tipo A, a indicação do subtipo entre parêntesis, (p.e. A/Mallard/Netherlands/22/2007 (H7N1), B/Lisboa/08/2006) [7].

## 1.2 Variação genética, *shift* e *drift* antigénicos

Como vírus de RNA, os vírus influenza necessitam da sua própria polimerase, constituída pelas subunidades proteicas polimerase básica 1 (PB1), polimerase básica 2 (PB2) e polimerase ácida (PA). A polimerase dos vírus influenza é uma polimerase de baixa fidelidade pois é desprovida da propriedade de *proofreading*, apresentando uma taxa de erro de aproximadamente 1 mutação por  $1 \times 10^4$  nucleótidos durante cada ciclo replicativo [8]. Algumas destas mutações são eliminadas por selecção natural, por tornarem o vírus menos eficaz em termos de replicação ou de evasão às defesas do hospedeiro. Outras poderão fixar-se por trazerem algum tipo de vantagem ao vírus, nomeadamente as que ocorrem nos locais antigénicos das glicoproteínas de superfície e que permitem ao vírus iludir a resposta imunológica do hospedeiro. Este processo de mutação pontual que gera uma alteração na composição ou conformação das glicoproteínas de superfície é designado de *drift* antigénico. Este processo evolutivo está na base da necessidade de monitorização constante dos vírus influenza em circulação sazonal, de forma a verificar a necessidade de actualização das medidas de prevenção e/ou controlo, nomeadamente a composição em cada inverno das vacinas antigripais (Figura 1A) [4].

Os vírus influenza do tipo A podem infectar aves domésticas e selvagens e outros tipos de animais sem causarem doença aparente. Alguns destes animais têm potencial para serem infectados por mais do que um subtipo de vírus influenza do tipo A e, quando isto acontece, podem surgir rearranjos entre segmentos genéticos de subtipos diferentes levando ao aparecimento de uma nova variante. Este processo de evolução por rearranjo entre segmentos genéticos de subtipos de vírus diferentes designa-se por *shift* antigénico (Figura 1B). A maioria dos vírus resultantes destes rearranjos torna-se inivável, e os restantes mantêm-se restritos à infecção dos respectivos hospedeiros devido à especificidade de ligação das hemaglutininas aos receptores de ácido siálico. No entanto, quando o *shift* antigénico ocorre permitindo que a nova variante resultante de um vírus zoonótico infecte o

Homem, poderemos estar perante um vírus com potencial pandémico se a população humana não apresentar qualquer tipo de imunidade contra essa nova variante [3, 4, 9].

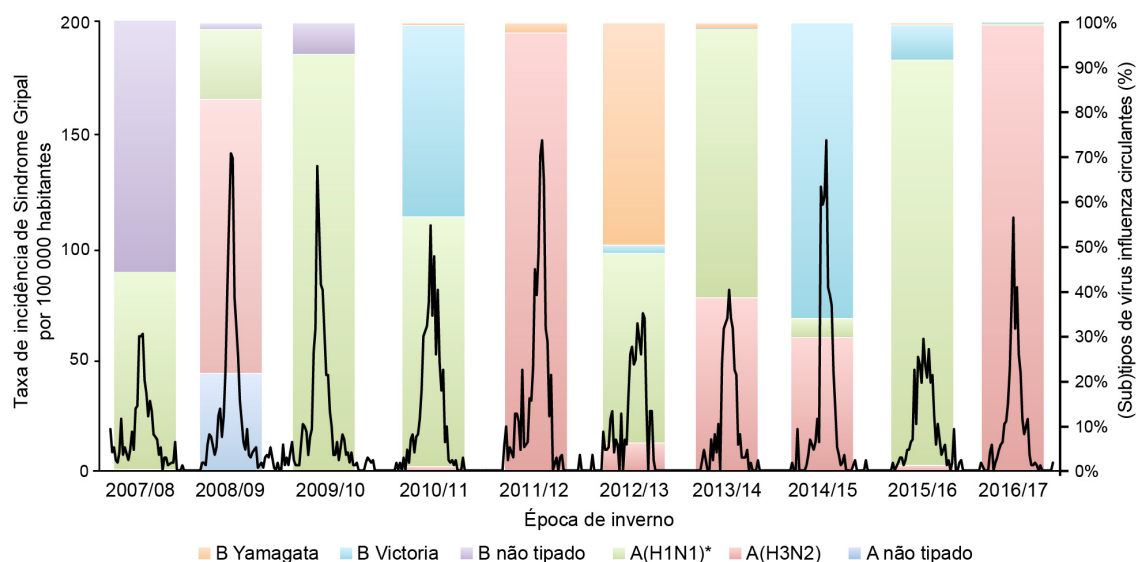


**Figura 1** – Representação esquemática dos processos evolutivos dos vírus influenza por *Drift* e *Shift* antigénico. **A** – *Drift* antigénico, a actividade da polimerase viral sem *proofreading* origina mutações pontuais no genoma viral, que se acumulam até ocorrer uma variação antigénica. **B** – *Shift* antigénico, quando ocorre rearranjo de segmentos genéticos de vírus diferentes, normalmente num hospedeiro que funciona como reservatório de recombinação, dando origem a um vírus com segmentos genéticos de ambas as linhagens.

### 1.3 Gripe sazonal e pandémica

A gripe é uma doença com carácter sazonal, maioritariamente associada ao período de inverno no hemisfério norte e, consequentemente, em Portugal (Figura 2), e meio ano mais tarde nos países do hemisfério sul (época fria local). Este carácter sazonal deve-se a vários factores conjugados que favorecem a transmissibilidade das partículas virais. As partículas virais transmitem-se por aerossóis, transmissão naturalmente favorecida em condições de temperaturas baixas, humidade elevada e diminuição de radiação ultra-violeta. Os comportamentos sociais também favorecem a sazonalidade da infecção por vírus influenza, considerando que nos meses de frio e chuva a sociedade adopta comportamentos de agregação em espaços fechados, favorecendo a transmissão de gotículas infectadas entre indivíduos. No entanto, casos esporádicos de infecção por vírus influenza podem ocorrer durante todo o ano, permitindo assim a continuidade da cadeia de transmissão do vírus [2, 4, 10].

Para além da sazonalidade da infecção, também se verifica uma alternância de (sub)tipos de vírus influenza dominantes entre épocas de inverno, uma vez que a população ganha imunidade natural contra o(s) (sub)tipo(s) circulante na(s) época(s) anterior(es) favorecendo assim a transmissibilidade dos restantes (sub)tipos (Figura 2) [4].



**Figura 2** – Taxa de incidência de síndrome gripal e (sub)tipos de vírus influenza circulantes registados em Portugal entre as épocas de 2007/2008 e 2016/2017. A curva a preto representa a taxa de incidência de síndrome gripal por 100 000 habitantes. Para cada época é ainda representado, em colunas percentuais, os (sub)tipos de vírus influenza que circularam em cada época. \* - a partir da época de inverno 2009/2010, inclusive, os vírus influenza A(H1N1) sazonal foram substituídos pela variante pandémica A(H1N1)pdm09. Adaptado de [11-18]

Este contacto permanente da população com vários (sub)tipos de vírus influenza permite criar uma memória imunológica para os (sub)tipos/variantes de vírus influenza sazonais. No entanto, quando ocorre uma variação antigénica, (1) por rearranjo de segmentos genéticos de vírus influenza de diferentes subtipos, (2) por transmissão de um vírus zoonótico ao Homem seguido de mutações adaptativas, ou (3) por ressurgimento de uma estirpe “adormecida” num reservatório animal em que, para estes vírus, a população humana (já) não apresenta qualquer memória imunológica estamos perante um vírus influenza com potencial pandémico que vai contagiar o Homem sem qualquer tipo de resistência imunitária com uma transmissão rápida e elevada, levando a uma propagação do novo vírus a nível global, num curto período de tempo, dando origem a uma pandemia. As pandemias provocadas pelo vírus influenza não são possíveis de prever nem ocorrem em intervalos de tempo definidos. Há registos históricos de possíveis pandemias desde o século V a.C., embora pouco se



conheça sobre a virologia das pandemias de gripe que ocorreram antes do século XX. No século XX, foram reconhecidas 3 grandes pandemias de gripe com principal destaque para a pandemia conhecida por “Gripe pneumónica” em 1918, pela sua elevada mortalidade (Tabela I) [2, 4].

A pandemia de gripe mais recente ocorreu já este século, em Abril de 2009, associada a uma nova variante de vírus influenza do subtipo A(H1N1).

**Tabela I** – Características das pandemias que ocorreram no século XX. Adaptado de George, 2014 [2]

Período	Designação	Subtipo	Mortalidade (global)	Mortalidade (Portugal)
1918 - 1919	Gripe Pneumónica	A(H1N1)	20 - 50 milhões	60 000 - 100 000
1957 - 1958	Gripe Asiática	A(H2N2)	1 - 4 milhões	1 050
1968 - 1969	Gripe de Hong Kong	A(H3N2)	1 - 4 milhões	s/ registo

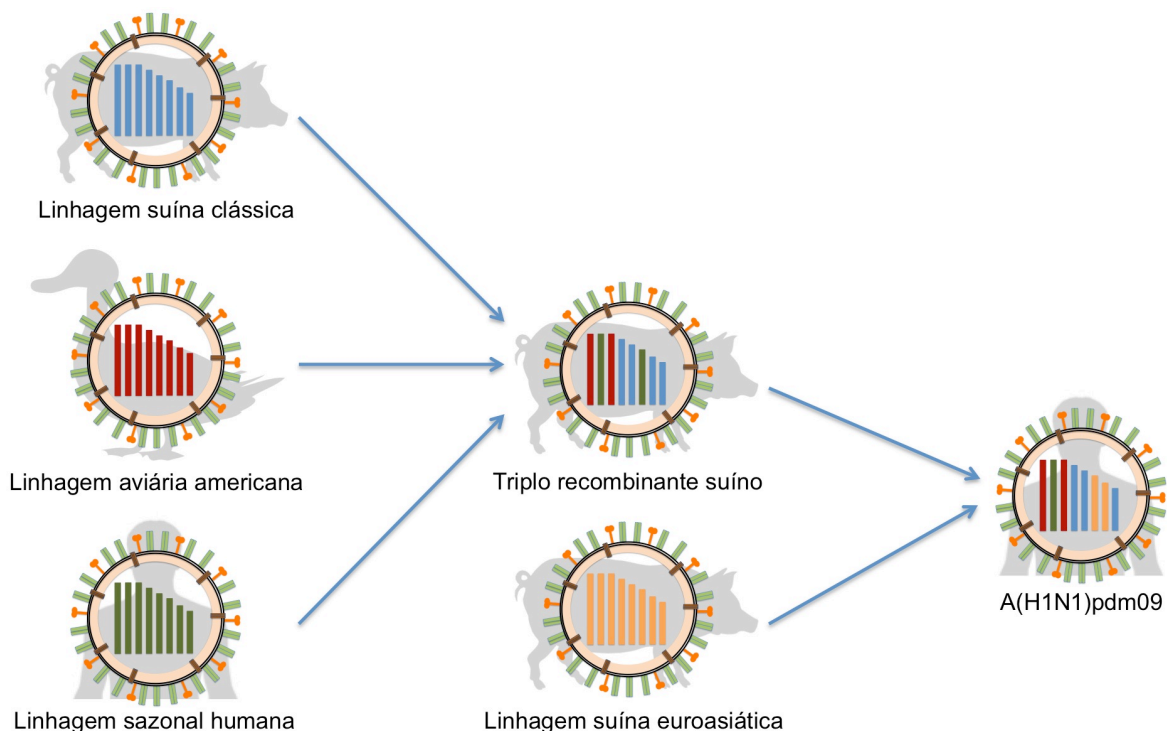
### 1.3.1 Pandemia A(H1N1)pdm09

Em 17 de Abril de 2009 foi detectado no tracto respiratório de duas crianças californianas uma nova variante de vírus influenza do subtipo A(H1N1), identificada como um recombinante entre um vírus triplo recombinante suíno (recombinante entre vírus suíno de linhagem clássica norte americana, vírus aviário de linhagem americana e vírus sazonal humano) e um vírus suíno da linhagem eurasiática (Figura 3).

Mais tarde, confirmou-se que esta nova variante de vírus influenza estava na origem de casos não usuais de síndrome gripal observados no México anteriormente a esta data, durante Março de 2009. A rápida propagação e dispersão desta nova variante a nível mundial levou a OMS a decretar a primeira pandemia de gripe do século XXI no dia 11 de Junho de 2009. O primeiro caso de gripe com a nova variante pandémica A(H1N1)pdm09 em Portugal foi detectado a 29 de Abril de 2009 e no total foram registados 200 000 casos e 124 mortes associadas a infecções com esta nova variante [2, 19].

## 1.4 Estrutura, genoma e proteínas

Os vírus influenza são partículas pleomórficas com cerca de 80 a 120 nm, com invólucro lipídico e genoma segmentado de RNA de cadeia simples e polaridade negativa (8 segmentos nos vírus influenza do tipo A e B e 7 segmentos nos vírus influenza do tipo C). Os segmentos genéticos dos vírus influenza codificam 16 proteínas no caso dos vírus influenza do tipo A, 11 nos vírus influenza do tipo B e 9 nos vírus influenza do tipo C [3].



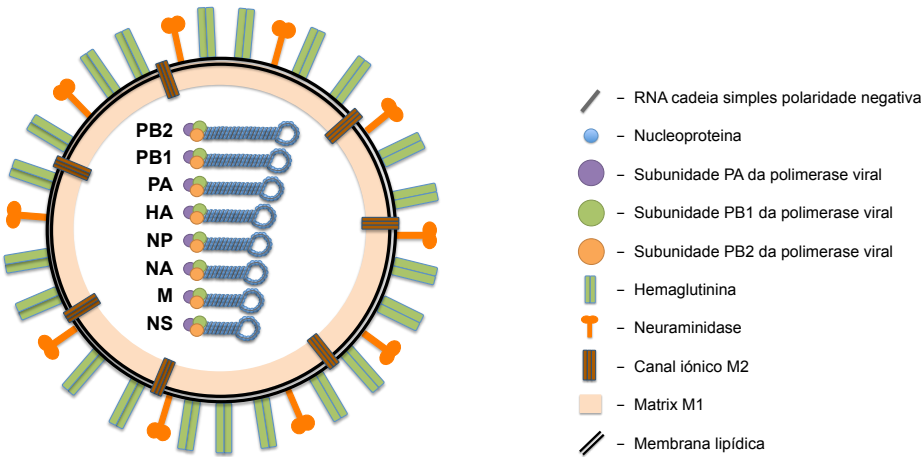
**Figura 3** – Representação esquemática dos processos de recombinação que deram origem à variante do vírus influenza A(H1N1)pdm09. Adaptado de Neumann *et al.*, 2009 [20]

No virião, os segmentos de RNA viral (vRNA) encontram-se envolvidos pela nucleoproteína (NP) e ligados na sua extremidade às subunidades da polimerase viral, PA, PB1 e PB2 formando os complexos de ribonucleoproteínas virais (vRNP). Os vRNP encontram-se ligados à matriz (M1) que dá estrutura e suporta o invólucro do virião, invólucro lipoproteico que apresenta um aspecto espiculado devido à presença das glicoproteínas de superfície HA e NA. O virião apresenta ainda um canal iónico M2 que atravessa o invólucro lipídico e a M1 (Figura 4). Para além da informação para estas proteínas estruturais, os vírus influenza contêm ainda no seu genoma informação para a proteína não estrutural NS1 que apenas é transcrita durante a replicação viral. Pensa-se que esta proteína estará associada à regulação de mecanismos celulares nas células infectadas [3, 4].

O genoma dos vírus influenza é constituído por aproximadamente 14 kb divididos pelos vários segmentos que se encontram resumidos na Tabela II.

O segmento 1 codifica a proteína PB2, subunidade básica 2 da polimerase viral. O principal papel da PB2 é a captura de mRNA celular com extremidade cap 5' que vai ser incorporada no vRNA e que é necessária à sua transcrição. A adição da extremidade cap 5' ao vRNA transcrito confere-lhe uma protecção contra a degradação pelas endonucleases celulares [21, 22]. A PB2 é também

considerada um determinante de virulência por apresentar a capacidade de inibir a resposta antiviral inata do hospedeiro, através da sua interacção com a proteína MAVS (*mitochondrial antiviral signaling*) inibindo a expressão de interferão  $\beta$  [23].



**Figura 4** – Representação esquemática da estrutura de um vírus influenza do tipo A. O invólucro viral é constituído por uma membrana lipídica contendo as glicoproteínas de superfície neuraminidase e hemaglutinina e os canais iônicos M2. A estrutura viral é suportada pela matriz M1. No interior da partícula viral encontram-se os complexos de ribonucleoproteínas virais (vRNP) de cada segmento viral, constituídos pelo RNA viral de cadeia simples e polaridade negativa envolto e organizado na nucleoproteína. Na sua extremidade o RNA viral encontra-se ligado à polimerase viral constituída por três subunidades, PB2, PB1 e PA.

**Tabela II** – Tamanho e proteínas codificadas por cada segmento genético dos vírus influenza. Adaptado de Rebelo-de-Andrade, 2014 [9]

Segmento	Influenza A			Influenza B			Influenza C			Influenza D		
	Tamanho (nt)	Proteína		Tamanho (nt)	Proteína		Tamanho (nt)	Proteína		Tamanho (nt)	Proteína	
1	2341	PB2		2396	PB2		2365	PB2		2364	PB2	
2	2341	PB1		2386	PB1		2363	PB1		2330	PB1	
		PB1-F2										
		PB1-N40										
3	2233	PA		2308	PA		2183	P3		2195	P3	
		PA-X										
		PA-N155										
		PA-N182										
4	1778	HA		2882	HA		2073	HE		2049	HE	
5	1565	NP		1842	NP		1807	NP		1775	NP	
6	1413	NA		1557	NA NB		-	-		-	-	
7	1027	M1		1188	M1 BM2		1180	M1		1219	M1	
		M2						P42			P42	
		M42						M2			M2	
8	890	NS1 NEP/NS2		1098	NS1 NEP/NS2		935	NS1 NEP/NS2		868	NS1 NEP/NS2	

O segmento 2 codifica a subunidade PB1 da polimerase viral e ainda as proteínas PB1-F2 e PB1-N40 nos vírus influenza do tipo A [24, 25]. A PB1 é a subunidade da polimerase viral responsável e essencial para a transcrição e replicação do vRNA [24, 26]. Nos vírus influenza do tipo A, a proteína PB1-F2 é codificada pela ORF(+1) do segmento viral 2 e apresenta um tamanho de 87 aminoácidos. Apenas é detectada nas células infectadas, não fazendo parte da constituição da partícula viral. A PB1-F2 é normalmente detectada no final do ciclo replicativo nas paredes da mitocôndria, fazendo com que haja uma perda da integridade da membrana mitocondrial que leva à indução da apoptose numa fase tardia da infecção [27-29]. Alguns estudos indicam ainda esta proteína como um regulador da actividade da polimerase, ou até mesmo como um factor de virulência [29]. Nalgumas estirpes apresenta-se sobre a forma truncada indicando que não é uma proteína essencial para a replicação viral [28]. Recentemente, foi identificada a proteína PB1-N40 com origem na transcrição do segmento PB1 num segundo codão de iniciação, que gera uma proteína com a mesma sequência da PB1 mas truncada 40 aminoácidos na região terminal N. Esta proteína é apenas transcrita nas células infectadas e perde a zona associada à transcrição na proteína PB1 [24, 25, 30]. Ainda pouco se sabe sobre esta proteína devido à sua recente descoberta.

O segmento genético 3 dos vírus influenza do tipo A e do tipo B codificam a subunidade PA da polimerase viral. À proteína PA é associado o papel de endonuclease uma vez que é responsável por clivar o mRNA celular com extremidade cap 5' capturado pela PB2. Esta clivagem do mRNA celular acontece entre os nucleótidos 10 e 13 após a extremidade cap 5' e este segmento vai servir de *primer* para a transcrição do segmento de vRNA pela PB1 [21, 22, 31]. Nos vírus influenza do tipo A o segmento genético 3 também dá origem, via transcrição ribossomal, à proteína PA-X. Apesar de esta proteína ser ainda pouco conhecida, os primeiros estudos com esta proteína demonstraram que ela aumenta a replicação viral, através da estimulação da actividade da polimerase, e tem a capacidade de inibir a resposta imunitária inata do hospedeiro aumentando assim a patogenicidade dos vírus que a apresentam [32, 33]. Outras duas proteínas codificadas por este segmento foram identificadas, a PA-N155 e a PA-N182, que se pensa poderem ter impacto no ciclo replicativo do vírus [34].

O segmento genético 4 codifica a proteína precursora da HA, a HA0, que quando clivada por proteases celulares nas subunidades HA1 e HA2 dá origem à HA funcional. A proteína HA é a glicoproteína de superfície responsável pela ligação do vírus influenza aos receptores de ácido siálico da célula no início do ciclo replicativo. A HA ainda é responsável por mediar a fusão da

membrana do invólucro viral com a membrana do endossoma para que ocorra a libertação dos vRNP [3, 35].

O segmento viral 5 codifica a nucleoproteína NP, a componente principal dos vRNP. Esta proteína encontra-se ligada ao vRNA de modo a mantê-lo organizado no virião, desempenhando um papel importante na transcrição e replicação do genoma viral [36]. A proteína NP tem ainda um papel essencial na importação e exportação dos vRNP entre o citoplasma e núcleo celular, apresentando um motivo NLS (*nuclear localization signal*) necessário à importação dos vRNP para o núcleo, onde irá ocorrer a transcrição dos vRNA e a formação de novos vRNP que se ligam à NEP (*Nuclear Export Protein*) e à M1 para formarem o complexo NEP-M1-vRNP, complexo este que é essencial à exportação dos recém formados vRNP do núcleo para o citoplasma, para que sejam posteriormente incorporados na progenia viral [37, 38].

O segmento viral 6 codifica outra importante proteína de superfície, a Neuraminidase. Esta é menos abundante que a HA e tem o principal papel de clivar as ligações da HA aos receptores de ácido siálico, função essencial para a libertação da progenia viral das paredes das células infectadas [3, 4]. Esta propriedade da NA permitiu o desenvolvimento de um tipo de antivirais contra o vírus influenza, os inibidores da NA, que se ligam ao sítio activo da NA impedindo que ocorra a clivagem da ligação da HA aos receptores de ácido siálico das células infectadas, fazendo com que a progenia viral fique ligada à membrana da célula, impedindo assim a infecção de mais células [39]. Nos vírus influenza do tipo B, este segmento codifica ainda uma segunda proteína, a NB, uma proteína membranar que pode ser encontrada na membrana das células infectadas e na membrana dos viriões. O seu papel no ciclo replicativo dos vírus influenza do tipo B não é, ainda, conhecido pois em estudos em que esta proteína não é expressa não é observado qualquer efeito na replicação viral [40].

O sétimo segmento do genoma viral codifica a proteína da matriz M1 e, por um mecanismo de *splicing*, as proteínas M2 e M42. A proteína matriz M1 é a responsável pela estrutura do virião encontrando-se distribuída por todo o lado interno do invólucro viral, estabelecendo ligações com todos os componentes virais, nomeadamente com os vRNP, com as glicoproteínas de superfície e com os canais iónicos M2. Como descrito anteriormente, durante o ciclo replicativo a proteína M1 migra para o núcleo onde se vai formar o complexo NEP-M1-vRNP, essencial para a exportação dos recém formados complexos vRNP do núcleo para o citoplasma [41]. A proteína M2 é um canal iónico presente no invólucro viral e apresenta um papel fundamental na fase inicial do processo replicativo.

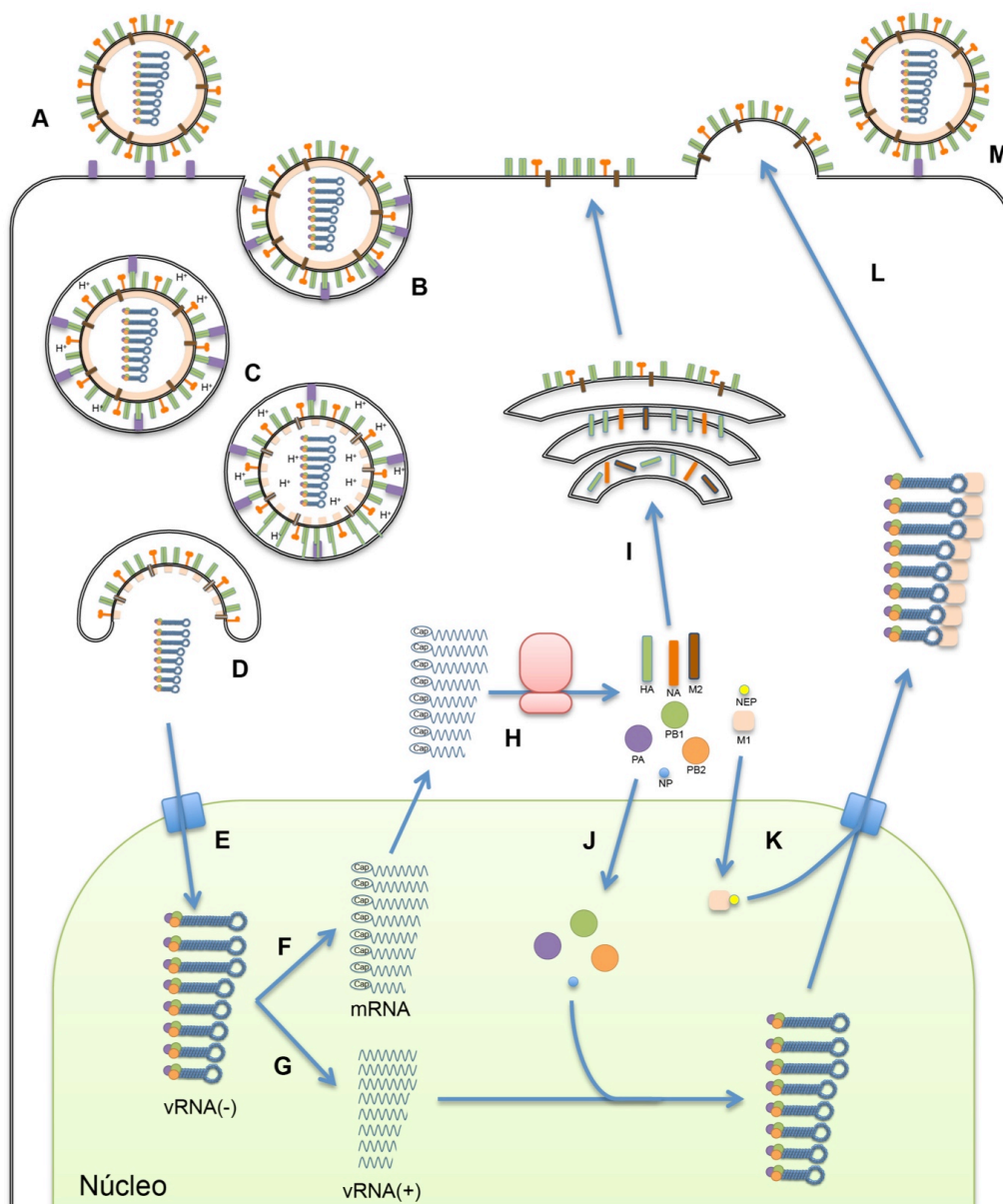
Após a endocitose da partícula viral o pH do interior do endossoma baixa, activando o canal iónico formado pela proteína M2 fazendo com que o pH no interior do virião também desça. Esta descida de pH leva a modificações na conformação da HA fazendo com que o invólucro viral se funda com a membrana do endossoma e ocorra a libertação dos vRNP para o citoplasma celular [3]. Esta proteína foi o alvo dos primeiros antivirais utilizados para o combate à infecção pelo vírus influenza, a amantadina e a rimantadina, que bloqueiam o canal iónico formado pela M2 impedindo assim a replicação viral. Contudo, estes antivirais só são eficazes contra os vírus influenza do tipo A, e em 1994-1995 começaram a surgir estirpes com mutações na proteína M2 que se estabeleceram nos vírus circulantes e que lhes conferiram resistência a esta classe de antivirais [42]. A proteína M42 está descrita como um *backup* da proteína M2, desempenhando as mesmas funções, particularmente em vírus mutados que não expressam a proteína M2 [43]. Nos vírus influenza do tipo B o segmento genético 7 codifica também a proteína BM2 que para além da função de canal iónico também lhe é associado um papel importante na incorporação dos vRNPs nas novas partículas virais [44, 45].

Por fim, o oitavo segmento codifica a proteína não estrutural 1 (NS1) e a NEP. A NS1 é uma proteína que só é transcrita na célula infectada e que não faz parte da constituição da partícula viral. É uma proteína com inúmeros domínios funcionais que interagem com componentes celulares e virais para regular vários mecanismos de modo a tornar possível, ou mais eficiente, o ciclo replicativo. Destaca-se a afinidade da sua ligação aos RNAs, capturando os mRNAs celulares impedindo a sua transcrição e protegendo os vRNA das RNases celulares, e a capacidade de manipular a defesa antiviral celular através da inibição da produção de IFN e da indução da apoptose além de ter um papel regulatório da polimerase viral [46, 47]. À proteína NEP, juntamente com a M1, como descrito anteriormente, é associada a função de exportação dos recém formados vRNP do núcleo para o citoplasma. Alguns estudos indicam ainda a NEP como reguladora da transcrição/replicação do genoma viral [48].

### **1.5 Ciclo replicativo**

Os vírus influenza começam o seu ciclo replicativo ligando-se aos receptores de ácido siálico presentes no tracto respiratório do hospedeiro. Esta ligação é mediada pela glicoproteína de superfície HA, que vai fazer com que a membrana da célula do hospedeiro comece a invaginar e

inicie o processo de endocitose da partícula viral. Este processo de defesa celular que passa pela compartimentação do corpo estranho à célula num endossoma para a sua destruição, na verdade vai ser essencial para a replicação viral pois a diminuição do pH no interior do endossoma vai ser responsável (1) pela alteração da conformação da HA ligada à parede interior do endossoma que vai fazer com que a membrana do endossoma e da partícula viral se fundam; e (2) por activar o canal iónico M2 que vai permitir a passagem dos prótons para o interior da partícula viral levando à dissociação das ligações M1-vRNP. Estas duas alterações provocadas pela diminuição do pH no interior do endossoma vão fazer com que ocorra a libertação dos complexos vRNP no citoplasma celular. A presença do motivo NLS na proteína NP viral vai fazer com que os complexos vRNP migrem do citoplasma para o núcleo da célula infectada. Uma vez no núcleo, a PB2 dos complexos vRNP vai capturar mRNA celular com extremidade Cap5' que vai ser clivado pela PA 10-13 nucleótidos após a extremidade Cap5', este segmento de mRNA clivado vai servir de *primer* para o início da transcrição do vRNA de sentido negativo, para RNA de sentido positivo pela PB1. Este RNA de sentido positivo transcrito pela polimerase viral vai (1) servir de *template* para a transcrição de mais vRNA pela RNA polimerase viral, e (2) migrar para o citoplasma e servir de mRNA para o início da tradução das proteínas virais, pelos ribossomas celulares. As recém formadas (1) NP, PB1, PB2 e PA migram para o núcleo da célula infectada para se ligarem ao vRNA recém replicado e formarem novos complexos vRNP; (2) M1 e NS2 vão igualmente migrar para o núcleo para formarem um complexo M1:NS2, responsável pelo transporte dos recém formados complexos vRNP do núcleo para o citoplasma; (3) HA, NA e M2 vão-se integrar na membrana celular após sofrerem uma maturação e glicosilação no retículo endoplasmático e no complexo de golgi, respectivamente e (4) NS1 vai impedir a maturação dos mRNAs celulares. Os recém formados complexos vRNP vão migrar para junto da membrana celular (já contendo as HA, NA e M2) onde vai ocorrer uma gemulação da membrana para formar a nova partícula viral. Por fim, a NA vai clivar as ligações entre a HA e os receptores de ácido siálico libertando a progenia viral [3, 4, 22, 49-51].



**Figura 5** – Representação esquemática do ciclo replicativo dos vírus influenza. A hemaglutinina dos vírus influenza liga-se aos receptores de ácido siálico da célula hospedeira (A) provocando uma invaginação da membrana celular e a ativação do processo de endocitose (B). A diminuição do pH dentro do endossoma (C) vai provocar uma alteração de conformação na HA e na M1 que faz com que a membrana do endossoma se funda com o envelope viral e ocorra a liberação dos complexos vRNPs para o citoplasma (D). O motivo NLS na HA viral vai fazer com que os complexos vRNP sejam transportados para o núcleo celular (E) onde vai ocorrer a transcrição (F) e replicação do genoma viral (G) pela RNA polimerase viral. O mRNA viral vai migrar para o citoplasma para ser processado pelos ribossomos celulares e dar origem às proteínas virais (H). As proteínas HA, NA e M2 vão sofrer um amadurecimento conformacional no retículo endoplasmático e complexo de golgi até serem incorporadas na membrana celular (I), a PA, PB1, PB2 e NP vão migrar para o núcleo para auxiliar a replicação do RNA viral e formarem novos complexos vRNP (J) e a NEP e a M1 vão migrar para o núcleo para formar um complexo NEP:M1 essencial para a exportação dos novos complexos vRNP (K). A proteína M1 vai manter-se ligada aos complexos RNP que vão migrar até à membrana celular onde se vão formar as novas partículas virais (L). Por fim, a clivagem das ligações HA:célula hospedeira pela NA vai levar à liberação da progenia viral (M). Adaptado de Das *et al.*, 2010 [3, 4, 22, 49-51]



## **1.6 Interações vírus/hospedeiro: vírus influenza e a apoptose**

Para além da função principal que cada proteína viral tem no ciclo replicativo dos vírus influenza muitas outras funções secundárias vão sendo reveladas e a maioria destas funções reflectem interações com mecanismos celulares mostrando que o vírus influenza foi evoluindo de modo a controlar/contornar a resposta celular inata às infecções [52-55]. Estudos reportam 1023 interações entre o vírus influenza e proteínas das células hospedeiras, levando ao controlo pelo vírus de alguns mecanismos celulares como por exemplo a via do fosfatidilinositol 3-cinase(PI3K)/Akt, a via do factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)/inibidor do NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), via das proteína-cinases activadas por mitógenos (MAPK) ou a via de sinalização da proteína cinase C(PKC)/proteína cinase R (PKR) [52, 53].

A proteína não estrutural NS1 tem um papel fundamental nas interações vírus-hospedeiro pois contém múltiplos domínios funcionais que interagem com diversas proteínas/vias celulares das células hospedeiras [46]. Uma das vias manipuladas por esta proteína é a activação da via de sobrevivência PI3K/Akt que vai inibir, numa fase inicial, a indução da apoptose activada como resposta celular à infecção, permitindo uma replicação viral mais eficiente [56, 57].

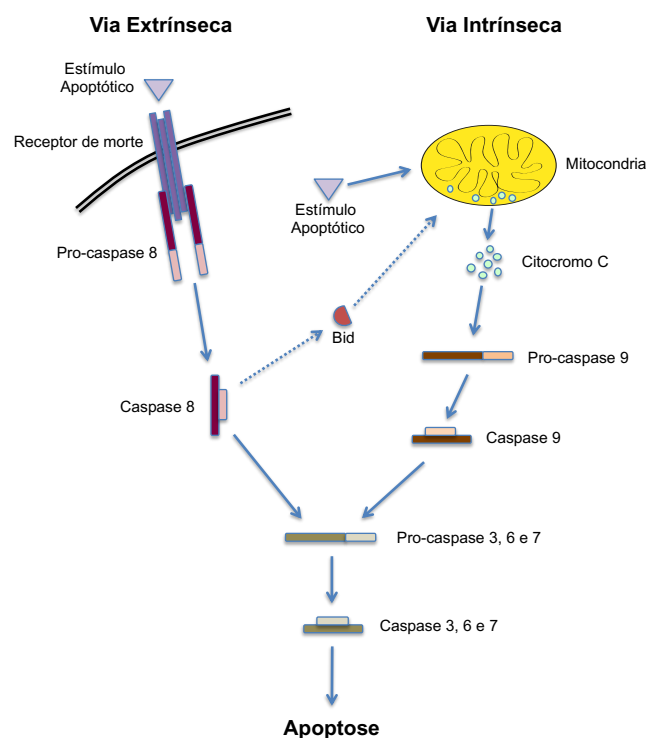
A apoptose é um processo celular através do qual a célula se suicida após receber um estímulo interno ou externo. Nos estudos que descrevem a interacção dos vírus influenza sobre a apoptose, uns associam esta interacção como uma manipulação da resposta celular antiviral, outros relatam que os vírus influenza desenvolveram estes mecanismos de interacção aproveitando-os para uma replicação mais eficiente [56, 58-60].

### 1.6.1 Apoptose

A apoptose é um processo controlado de morte celular em que através de vários acontecimentos bioquímicos a célula sofre alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas que a levam a uma morte individualizada sem afectar as células adjacentes, evitando uma resposta inflamatória. As células em apoptose são caracterizadas por uma agregação e marginalização da cromatina, diminuição do volume citoplasmático, condensação do núcleo e culmina com a fragmentação da célula em corpos apoptóticos que irão ser fagocitados por outras células [61, 62].

Existem duas vias principais que levam à apoptose nas células, a via extrínseca (ou via dos receptores de morte) e a via intrínseca (via mitocondrial) que vão activar uma cascata de caspases, uma família de proteases de cisteína com especificidade para resíduos de ácido aspártico. Na via

extrínseca, a forma inactiva da caspase iniciadora 8 encontra-se ligada aos receptores de morte presentes na membrana celular. Quando um estímulo apoptótico externo se liga aos receptores de morte, vai ocorrer a activação da caspase 8 que por sua vez vai activar as caspases efectoras 3, 6 e 7 que vão levar à apoptose da célula. Na via intrínseca, estímulos apoptóticos internos vão influenciar a permeabilidade da mitocôndria celular e, consequentemente, levar à libertação de citocromo c. A presença de citocromo c no citoplasma vai levar à activação da caspase iniciadora 9 que por sua vez vai activar as caspases efectoras 3, 6 e 7 e levar a célula a entrar em apoptose. A activação da caspase 8 na via extrínseca poderá ainda activar a clivagem da Bid que irá influenciar a permeabilidade da membrana mitocondrial recrutando assim também a activação da via intrínseca (Figura 6) [63-66].



**Figura 6** – Representação esquemática das vias de indução da apoptose. Na via extrínseca, um estímulo apoptótico externo liga-se aos receptores de morte levando à activação da caspase 8 que por sua vez vai activar as caspases efectoras 3, 6 e 7 que vão levar à apoptose da célula. Na via intrínseca, estímulos apoptóticos internos vão influenciar a permeabilidade da mitocôndria celular levando à libertação de citocromo c. A presença de citocromo c no citoplasma vai activar a caspase iniciadora 9 que por sua vez vai activar as caspases efectoras 3, 6 e 7 e levar a célula a entrar em apoptose. A activação da caspase 8 na via extrínseca poderá ainda activar a clivagem da Bid que irá influenciar a permeabilidade da membrana mitocondrial recrutando assim também a activação da via intrínseca. Adaptado de Sola *et al.*, 2001 [62]

As proteínas celulares da família Bcl-2 têm um papel fundamental na apoptose, os membros desta família partilham uma estrutura semelhante, diferindo entre elas nalguns domínios funcionais. Uns

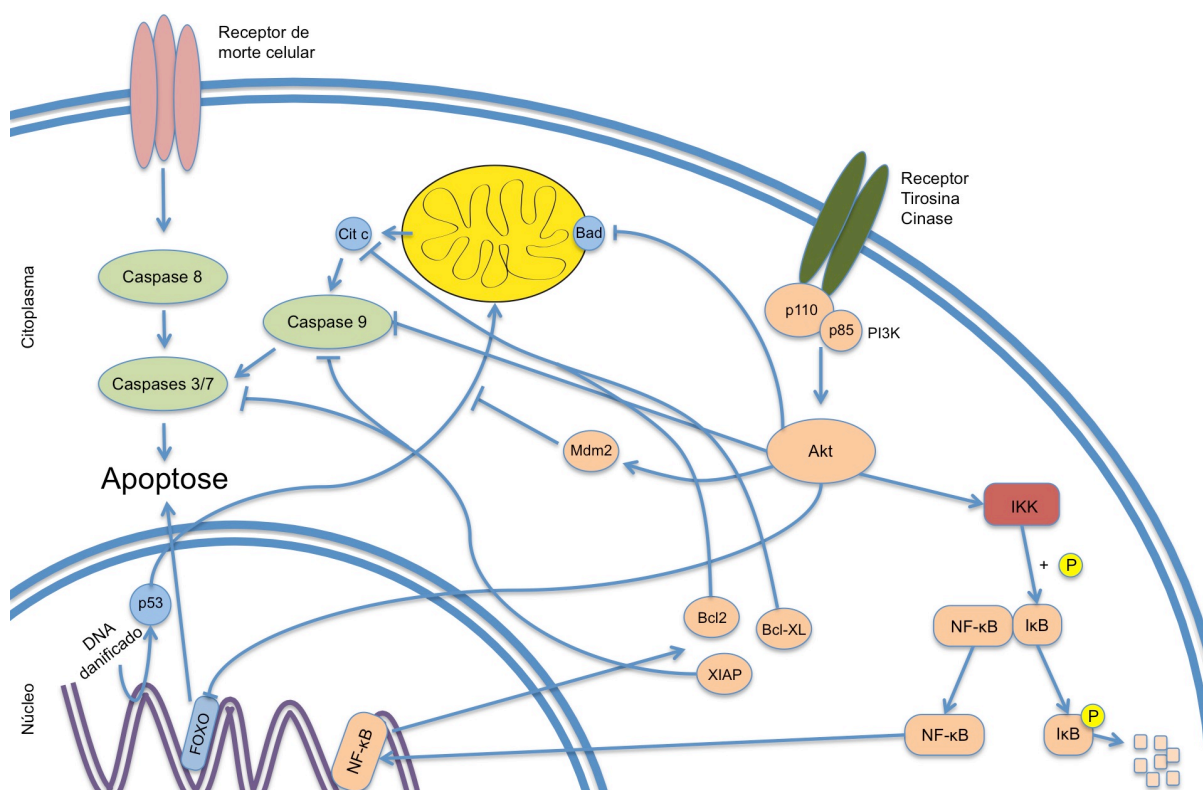
elementos desta família têm função anti-apoptótica outros têm função pro-apoptótica e é o equilíbrio entre os membros desta família que decide o destino da célula. A presença de um estímulo interno/externo vai levar à alteração deste equilíbrio fazendo com que a célula entre, ou não, no processo apoptótico [67]. Outra família de proteínas importantes no processo da apoptose são as proteínas inibidoras da apoptose (IAPs), enquanto as proteínas da família Bcl-2 regulam a entrada ou não no processo apoptótico, as IAPs têm a capacidade de inibir o processo de apoptose já em curso (numa fase inicial) actuando ao nível da inibição das caspases [68].

A apoptose é um processo importante na resposta celular às infecções virais pois permite que a célula cometa suicídio para impedir/reduzir a replicação viral, no entanto, a rápida evolução dos vírus permitiu-lhes desenvolverem mecanismos para contornar/manipular esta resposta celular [69].

#### 1.6.2 Controlo da apoptose pela NS1

A proteína NS1 tem um papel importante nas interacções vírus-hospedeiro com vários domínios funcionais já descritos que interagem com diferentes mecanismos/proteínas celulares [46]. O motivo SH3 da NS1 está descrito como um motivo com afinidade de ligação à subunidade p85 $\beta$  do PI3K fazendo com que a presença da NS1 se ligue ao PI3K activando a via de sobrevivência do PI3K/Akt [70]. A via do Akt tem sido descrita como estando implicada tanto na sobrevivência da célula infectada como na eficiência da replicação viral pois vai inibir a apoptose induzida pela infecção viral [56, 70, 71]. O Akt tem vários alvos que podem levar à inibição da apoptose, como a fosforilação da Caspase 9, a activação da proteína Mdm2 – inibidor do factor pro-apoptótico p53, a inibição dos factores pró-apoptóticos FOXO e Bad ou a activação da I $\kappa$ B cinase, entre outros (Figura 7) [56, 70, 72-78].

A I $\kappa$ B cinase (IKK), um dos alvos do Akt, por sua vez é responsável pelo controlo da activação do factor de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B. Em condições de equilíbrio celular, o NF- $\kappa$ B encontra-se retido no citoplasma celular através da interacção com a proteína I $\kappa$ B que vai impedir que o NF- $\kappa$ B migre para o núcleo [79]. Após um estímulo de activação, a IKK vai fosforilar a proteína I $\kappa$ B levando à sua dissociação do NF- $\kappa$ B, permitindo a migração deste factor de transcrição para o núcleo onde vai induzir a transcrição de proteínas de sobrevivência, como a Bcl-XL, a Bcl-2 e a XIAP (Figura 7) [80-82].



**Figura 7** – Representação esquemática dos factores anti-apoptóticos activados pela via de sobrevivência do PI3K/Akt. O Akt tem vários alvos anti-apoptóticos: a fosforilação da Caspase 9; a activação da proteína Mdm2 – inibidor do factor pro-apoptótico p53; a inibição dos factores pró-apoptóticos FOXO e Bad; e a activação da IκB cinase. A activação da IκB cinase vai fosforilar a proteína IκB levando à sua dissociação do NF-κB, permitindo a migração deste factor de transcrição para o núcleo onde vai induzir a transcrição de proteínas de sobrevivência, como a Bcl-XL, a Bcl-2 e a XIAP.

Para além do PI3K/Akt, a NS1 também tem a capacidade de interagir com a PKR, a inibição do OAS/RNase L e o JNK/AP-1. Interações que também se encontram descritas como capazes de inibir a indução da apoptose, durante a infecção com vírus influenza [46]. No entanto, alguns estudos mostram que a NS1 pode ter também um papel pro-apoptótico, indicando que a NS1, em relação à sua interacção com o mecanismo de apoptose, poderá ter dois papéis durante o ciclo replicativo, um inicial de inibição que vai permitir que o vírus se replique e outro mais tardio de indução permitindo assim a fagocitose da célula infectada [46].

### 1.6.3 Indução da apoptose pela PB1-F2

A proteína PB1-F2 é uma proteína codificada pela ORF(+1) do gene PB1 e esta proteína, em conjunto com a NS1 está amplamente descrita como ligada ao controlo da apoptose das células infectadas. No entanto, a PB1-F2, ao contrário da NS1, tem a capacidade de induzir a apoptose

ligando-se à membrana mitocondrial onde vai formar um poro que vai conduzir à libertação do citocromo c para o citoplasma celular, levando à activação da caspase 9 e da apoptose através da via intrínseca numa fase tardia na infecção. No entanto, esta proteína apresenta-se na forma truncada nalgumas estirpes de vírus influenza (caso da variante AH1N1pdm09), perdendo a capacidade de indução da apoptose. A falta desta funcionalidade nalgumas estirpes não faz com que o ciclo replicativo seja menos eficiente dando uma indicação que a indução da apoptose pela proteína PB1-F2 numa fase tardia da infecção não é um processo essencial para a replicação do vírus influenza. No entanto, as estirpes com a proteína PB1-F2 funcional apresentam uma maior patogenicidade comparativamente com as restantes [27, 83-85].

#### 1.6.4 Outras proteínas virais que influenciam a apoptose celular

Para além das proteínas NS1 e PB1-F2, encontram-se descritas outras proteínas como tendo um possível impacto no processo apoptótico das células infectadas.

Um estudo reportou que a PA de um dos vírus influenza tem a capacidade de interagir com 33 proteínas mitocondriais, embora, à data, não tenham sido publicados estudos do impacto destas interações na indução/inibição da apoptose, é possível que esta interacção interfira de alguma maneira com a estabilidade da membrana mitocondrial, elemento chave na activação da apoptose pela via intrínseca [86].

A proteína NP também é apontada em vários estudos como responsável pela indução da apoptose celular, através da inibição de factores anti-apoptóticos, reportando a apoptose como processo essencial para uma replicação e libertação eficaz da progenia viral [87-89].

As glicoproteínas de superfície HA e NA também foram descritas como tendo um papel na indução da apoptose, no entanto, estudos recentes também apontam a NA como um factor indutor da sobrevivência celular durante a infecção [90-93].

A proteína M1 não induz directamente a apoptose da célula infectada, mas está descrito que parte da M1 consegue ligar-se ao factor anti-apoptótico Hsp70 (*heat-shock protein 70*) impedindo assim que este se ligue à protéase de activação da apoptose 1 (Apaf-1) e iniba a indução da apoptose. Igualmente, a proteína M2, vai levar de modo indirecto à indução da apoptose, pois ao impedir a fusão dos endossomas com os fagossomas, impede a degradação controlada destes. A presença de fagossomas na célula infectada vai activar os mecanismos de apoptose na célula infectada [94-96].

Muitos são os estudos que exploram as várias vias, proteínas e/ou factores que estão implicados nas interacções vírus/hospedeiro que levam à inibição/indução da apoptose das células infectadas. Uma das armas que as células apresentam para combater os vírus e controlar a sua replicação. No entanto, toda esta bibliografia reporta estudos feitos com estirpes de vírus influenza do tipo A, estando o conhecimento em relação às estirpes do tipo B muito reduzido, sabendo-se apenas que a infecção com vírus do tipo B também induz a apoptose das células infectadas [97].

## **2 Hipótese de trabalho e objectivos**

Esta página foi intencionalmente deixada em branco



## **2.1 Hipótese de trabalho**

Nos últimos anos têm sido publicados vários trabalhos a associar a infecção por vírus influenza do tipo A (nomeadamente os do subtipo A(H1N1) sazonal, A(H3N2) e A(H5N1)) com o mecanismo celular da apoptose. Porém, à data do início deste trabalho, havia poucos estudos sobre o mesmo tema relativamente aos vírus influenza do tipo B e nenhum sobre os vírus influenza da nova variante pandémica A(H1N1)pdm09.

A maioria dos estudos refere o papel de diferentes proteínas virais dos vírus influenza do tipo A na indução/inibição da apoptose celular. De entre essas proteínas é à NS1 dos vírus influenza do tipo A (NS1A) que tem sido atribuída uma grande relevância, devido à sua capacidade de retardar a apoptose da célula infectada através da activação da via de sobrevivência do PI3K/Akt.

Por sua vez, a proteína não estrutural dos vírus B (NS1B), menos estudada que a dos vírus influenza do tipo A, difere a nível estrutural, funcional e genético das do tipo A.

Tendo em conta os aspectos referidos anteriormente, formulou-se a seguinte hipótese de trabalho:

Os vírus influenza do tipo A e os vírus influenza do tipo B activam diferentes vias e perfis cinéticos de indução da apoptose nas células infectadas.

## **2.2 Objectivos**

Com este trabalho de investigação pretende-se contribuir para o conhecimento dos mecanismos de apoptose associados à infecção por vírus influenza do tipo A e do tipo B.

Com a emergência de uma nova variante de vírus influenza do tipo A, que deu origem à pandemia de 2009 e que posteriormente se estabeleceu como uma variante sazonal responsável pelas epidemias gripais dos invernos subsequentes, e a falta de informação da genética, evolução e impacto no hospedeiro, tornou-se necessário estudar esta nova variante, quer a nível genético, quer o seu impacto no controlo da apoptose das células infectadas.

Para testar a hipótese proposta para este trabalho, foram estabelecidos um objectivo geral e quatro objectivos específicos.

Adicionalmente, para alguns dos objectivos específicos foi estipulado um desenvolvimento experimental para implementar metodologias e/ou preparar material biológico necessário para o cumprimento desse objectivo.

### **2.2.1 Objectivo geral**

- Determinação das diferenças na indução da apoptose em infecções pelos principais tipos de vírus influenza que infectam o Homem (tipo A e tipo B) assim como os principais factores, virais e celulares, que contribuem para essa diferença.

### **2.2.2 Objectivos específicos**

1. Selecção de uma estirpe de vírus influenza representativa da nova variante pandémica A(H1N1)pdm09 e de uma estirpe representativa dos vírus influenza do tipo B (linhagem B/Victória);
2. Avaliação das diferenças cinéticas na indução da apoptose entre a infecção por vírus influenza do tipo A e a infecção por vírus influenza do tipo B;
3. Análise comparativa das diferenças na resposta celular em infecções pelos diferentes tipos de vírus influenza, em particular nos mecanismos e na síntese de factores celulares envolvidos na apoptose;
4. Determinação dos componentes virais, muito em particular os factores genéticos, que induzem as diferenças na apoptose na infecção pelos diferentes tipos de vírus influenza.

### **2.3 Desenvolvimento experimental previsto**

Para além das metodologias já existentes nos laboratórios onde este trabalho foi desenvolvido, de modo a cumprir os objectivos específicos estabelecidos foi necessário, à priori, proceder a um

desenvolvimento experimental de implementação/aferição de algumas metodologias assim como à preparação de material biológico.

Assim, de modo a conseguir cumprir o primeiro objectivo específico, e pelo facto de estarmos, no início deste trabalho, perante a emergência de uma nova variante de vírus influenza pouco conhecida, foi necessário proceder a um estudo genético e evolutivo das estirpes de vírus influenza da nova variante pandémica A(H1N1)pdm09 que circularam em Portugal no início da pandemia de 2009. Para este estudo foi necessário proceder à:

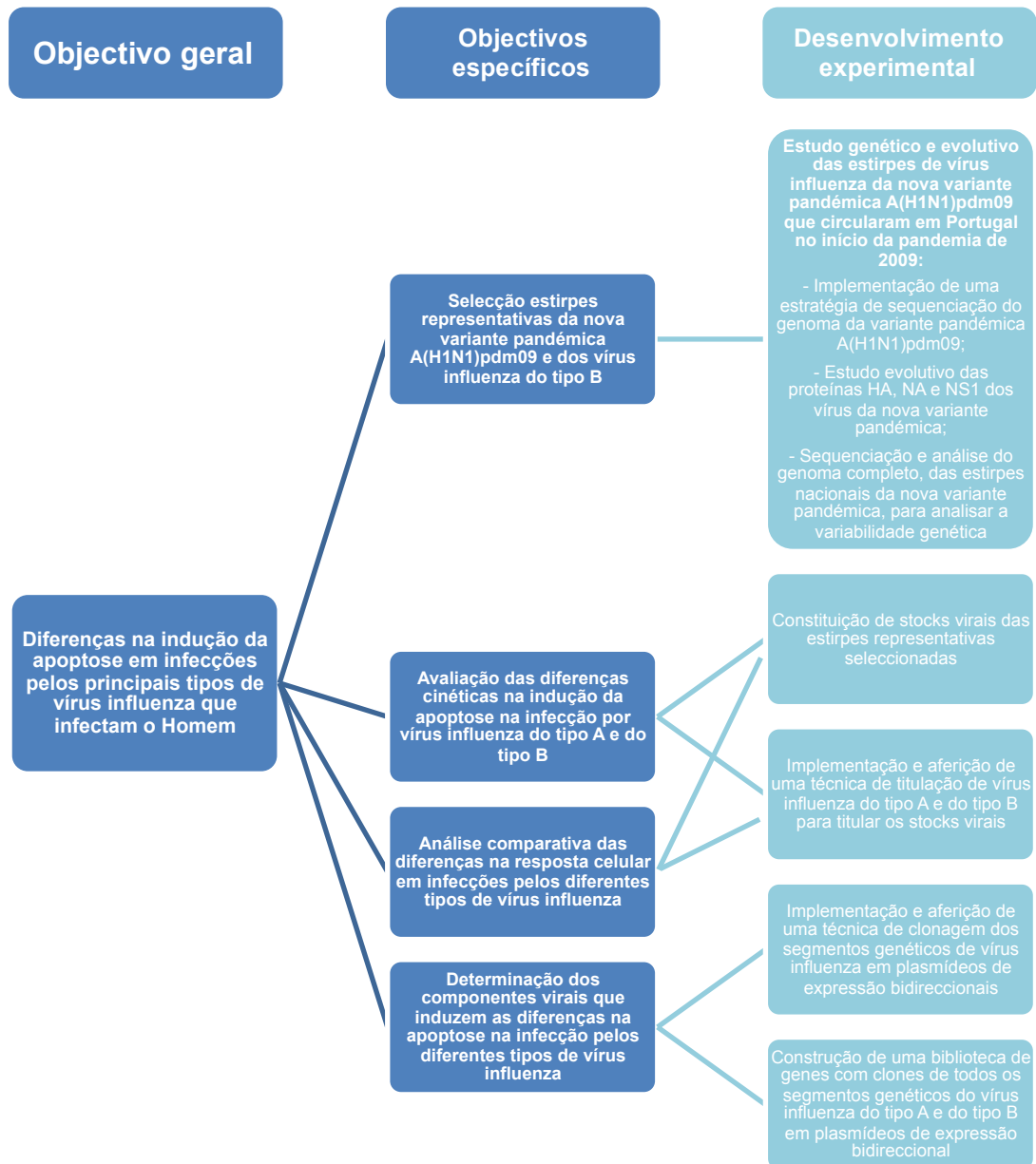
- Implementação de uma estratégia de sequenciação do genoma da nova variante pandémica de vírus influenza A(H1N1)pdm09;
- Sequenciação e estudo evolutivo das proteínas antigénicas de superfície HA e NA e da proteína não estrutural NS1 dos vírus influenza da nova variante pandémica que circularam em Portugal no início da pandemia;
- Sequenciação do genoma completo dos vírus influenza da nova variante pandémica para analisar a variabilidade genética das estirpes nacionais e seleccionar uma estirpe representativa da variante A(H1N1)pdm09.

Para os segundo e terceiro objectivos específicos foi necessário garantir um volume suficiente, para todos os ensaios, de vírus com uma concentração conhecida, de modo a ser possível o estudo da apoptose em células infectadas com a mesma dose infecciosa entre cada vírus. Para tal, foi necessário:

- Constituir stocks virais das estirpes representativas da variante A(H1N1)pdm09 e do tipo B seleccionadas para este trabalho
- Implementar e aferir uma técnica de titulação de vírus influenza do tipo A e do tipo B que permita titular os stocks virais constituídos;

A determinação dos componentes virais, muito em particular os factores genéticos, que induzem as diferenças na apoptose na infecção pelos diferentes tipos de vírus influenza, foi estudada através do efeito da transfecção de células com cada um dos segmentos virais clonados em plasmídeo de expressão. Para obter estes plasmídeos foi necessário:

- Implementar e aferir uma técnica de clonagem dos segmentos genéticos de vírus influenza em plasmídeos de expressão bidireccionais;
- construir uma biblioteca de genes com clones de todos os segmentos genéticos do vírus influenza do tipo A e do tipo B em plasmídeos de expressão bidireccional.



**Figura 8** – Diagrama resumo do objectivo geral e dos objectivos específicos estipulados para este trabalho e do desenvolvimento experimental necessário de implementar/aferir para o cumprimento de dos objectivos estipulados.

### **3 Caracterização genética dos vírus A(H1N1)pdm09 circulantes em Portugal**

Os resultados presentes neste capítulo contribuíram para as seguintes publicações:

- Gíria MT, Rebelo de Andrade H, **Santos LA**, Correia VM, Pedro SV, Santos MA. *Genomic signatures and antiviral drug susceptibility profile of A(H1N1)pdm09*. J Clin Virol, 2012. 53: 140-144;
- **Santos LA**, Correia V, Gíria M, Pedro S, Santos MM, Silvestre MJ, Rebelo-de-Andrade H. *Genetic and antiviral drug susceptibility profiles of pandemic A(H1N1)v influenza virus circulating in Portugal*. Influenza Other Respir Viruses, 2011. 5 (Supl. 1), 294–300;
- **Santos LA**, Correia V, Pedro S, Alverca E, Santos MM, Silvestre MJ, Rebelo-de-Andrade H. *Caracterização genética da nova variante pandémica do vírus influenza A(H1N1) 2009 em circulação em Portugal: resultados preliminares*. Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas, 2010. 6(1): 7-13;

O material biológico utilizado neste capítulo foram estirpes de vírus influenza A(H1N1)pdm09 isoladas no Laboratório de Resistência aos Antivirais do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge pela Dra. Vanessa Correia a partir de amostras clínicas com diagnóstico molecular positivo para vírus influenza A(H1N1)pdm09 gentilmente cedidas pelas Doutora Maria José Silvestre e Doutora Maria Madalena Almeida Santos do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar Lisboa Centro - Hospital Curry Cabral.

A maioria da metodologia descrita neste capítulo foi executada pelo autor da tese, Luis André Santos, tendo a Doutora Marta Gíria e a Dra. Vanessa Correia auxiliado na sequenciação do genoma de algumas das estirpes estudadas.

### **3.1 Resumo**

Em Abril de 2009 uma nova variante do vírus influenza do subtipo A(H1N1) propagou-se rapidamente por todo o mundo, causando a primeira pandemia do século XXI. Embora a maioria dos casos associados à infecção com esta nova variante tenha tido uma apresentação clínica moderada, casos graves e fatais foram reportados [98]. No contexto de uma pandemia, a caracterização genética, a dinâmica de evolução molecular e a análise das implicações na saúde pública exigem uma análise sistemática dos vírus em circulação, quer a nível global quer a nível regional. Com a ausência desta informação a nível nacional, quando se iniciou a preparação do trabalho para esta tese, foi necessário priorizar a caracterização e evolução genética das estirpes em circulação no país. Este estudo contribuiu não só para a selecção de uma estirpe portuguesa, representativa da nova variante A(H1N1)pdm09, a ser utilizada nos ensaios subsequentes desta tese, como também para monitorizar a evolução genética das estirpes circulantes a nível nacional no início da pandemia.

Para a caracterização e estudo evolutivo das estirpes em circulação em Portugal, foi necessário implementar a metodologia de sequenciação desta nova variante e estudo genético das glicoproteínas de superfície, HA e NA, e da proteína não estrutural NS1 (proteína associada à inibição da apoptose nos vírus influenza do tipo A). Foi ainda estudado o genoma completo de algumas estirpes de forma a verificar se os genes internos das estirpes portuguesas apresentavam a mesma assinatura genética dos circulantes nas diferentes regiões, a nível global. Assim como verificar a proximidade das estirpes circulantes no Homem com as estirpes zoonóticas representativas das linhagens que deram origem ao vírus da variante pandémica A(H1N1)pdm09.

### **3.2 Implementação e aferição de um protocolo de sequenciação genómica para os vírus da variante pandémica A(H1N1)pdm09**

Para agilizar o processo de sequenciação e tornar acessível o maior número de informação genética possível a nível global, a OMS disponibilizou no seu sítio de internet um protocolo de sequenciação, desenvolvido pelo CDC para esta nova variante a 29 de Abril de 2009, com uma actualização do mesmo a 12 de Maio de 2009 [99]. A estratégia de sequenciação deste protocolo passa pela amplificação por RT-PCR de vários fragmentos de cada segmento genético, com sobreposição entre eles, utilizando *primers* específicos para o fragmento a amplificar aos quais foi adicionada uma terminação 5' com a sequência nucleotídica dos *primers* universais M13. A adição desta terminação,

permite a utilização dos *primers* M13 *forward* e *reverse* na reacção de sequenciação cíclica de todos os fragmentos amplificados.

### 3.2.1 Optimização dos primers

Considerando que o vírus influenza adquire, normalmente, mutações no processo de adaptação ao Homem e que o protocolo acima referido foi disponibilizado pela OMS após o surgimento dos primeiros casos registados no México, antes do início da pandemia, foi necessário proceder ao levantamento de sequências de várias estirpes da variante pandémica de modo a verificar a adequabilidade dos *primers* descritos para as estirpes circulantes. Para tal, procedeu-se ao levantamento das sequências de cada gene disponíveis nas bases de dados internacionais, e ao seu alinhamento com as sequências dos *primers*. As sequências foram analisadas e os *primers* foram ajustados de modo a minimizar as diferenças entre a sequência dos *primers* e as sequências das estirpes da nova variante A(H1N1)pdm09. Das várias bases de dados disponíveis na altura da pandemia, a base de dados de referência onde se encontrou a informação mais recente e sistematicamente actualizada foi a base de dados GISAID [100]. Assim, o levantamento de sequências dos segmentos genéticos foi restringido a esta base de dados de modo a evitar a presença de duplicados. As sequências utilizadas foram todas as referenciadas como pertencentes a estirpes da nova variante pandémica e com a maioria da sequência do gene disponível. Para cada segmento genético foram utilizadas entre 38 e 61 sequências. A lista das sequências utilizadas e respectivos números de acesso encontra-se disponível no ANEXO A.

As sequências foram alinhadas entre elas e com as sequências dos *primers* utilizando o programa bioinformático *Megalign* (Lasergene v7.0.0, DNASTAR, Madison, WI, USA; <http://www.dnastar.com>). A sequência do *primer* foi alterada sempre que se verificou uma diferença entre a base nucleotídica do *primer* e a base *consensus* das estirpes utilizadas nesta análise. Assim, sempre que todas as sequências apresentavam uma base nucleotídica diferente da presente no *primer*, esta foi alterada no *primer* para a base nucleotídica correspondente. Quando a diferença foi observada em apenas algumas das estirpes, alterou-se a base nucleotídica no *primer* pela base nucleotídica degenerada correspondente. As alterações à sequência original dos *primers* encontram-se descritas na Tabela III assinaladas a negrito.



### 3.2.2 Implementação do protocolo

Para a implementação do protocolo de sequenciação genómica da variante pandémica A(H1N1)pdm09 foi utilizada a estirpe A/Portugal/02/2009, por ter sido uma das primeiras estirpes isoladas no laboratório com título e volumes ideais para a aferição do protocolo de sequenciação. Para a extracção do RNA viral foi utilizado o kit de extracção *QIAamp® Viral RNA Mini kit* (QIAGEN, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, no processo de extracção de RNA viral o vírus é lisado através da utilização de um tampão caotrópico que contém uma molécula “RNA carrier” que captura o RNA viral e ajuda a que este fique retido na membrana de sílica presente na coluna de extracção. A membrana é lavada com tampões de lavagem de forma a eliminar todos os contaminantes celulares. Por fim o RNA assim purificado é eluído da membrana com um tampão específico.

No protocolo de sequenciação disponibilizado, os diferentes fragmentos dos segmentos genéticos são transcritos e amplificados por RT-PCR através da utilização do kit *AccessQuick™ RT-PCR System* (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) e dos *primers* específicos para cada segmento. Nesta reacção são utilizados *primers* específicos de cada segmento viral com uma extensão de 18 bases nucleotídicas (bases nucleotídicas referentes à sequência dos *primers* universais M13) na extremidade 5' que irão ser incorporadas em todos os fragmentos amplificados durante a reacção de RT-PCR, permitindo assim a utilização dos *primers* universais M13 na reacção de sequenciação cíclica (Tabela III).

A aplicação dos primers optimizados no protocolo da OMS permitiu a amplificação, com qualidade, de todos os fragmentos não havendo necessidade de aferição das condições de reacção descritas. Resumidamente, foram utilizados 2 µl de eluído de RNA viral em 13 µl de mistura de reacção incubados nas seguintes condições: 48°C durante 45 minutos (transcrição reversa), 94°C durante 2 minutos (desnaturação), e 30 ciclos de 20 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C e 1 minuto a 72°C (amplificação), com uma incubação final de 7 minutos a 72°C (extensão final). Estas condições estão descritas na Tabela IV.

A verificação da amplificação foi realizada por electroforese em gel 1,2 % agarose (SeaKem® LE agarose, Lonza, Rockland, Maine, EUA) em 1x Tris-Borato-EDTA (TBE; 0,09M Tris, 0,09M ácido bórico e 2,5mM EDTA) corado com *GelRed™* (Biotium, Hayward, California, EUA), e o tamanho dos fragmentos amplificados confirmado por comparação com um marcador de pesos moleculares de

fragmentos incrementados de 100 bp. A purificação dos fragmentos amplificados (degradação de *primers* e dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados - não incorporados por ação de uma nuclease e uma fosfatase) foi realizada com o kit *ExoSAP-IT<sup>TM</sup>* (USB, GE Healthcare, Cleveland, Ohio, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

**Tabela III** – Lista de *primers* utilizados na sequenciação do genoma do vírus A(H1N1)pdm09. Adaptado do protocolo disponibilizado pela OMS [99].

Gene/ Fragmento	Primer Forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')	Tamanho Fragmento (pb)
PB2	1 TGTA AACGACGGCCAGT CTCGAGCAAAGCAGGTCAA	CAGGAAACAGCTATGACC YAG <b>Y</b> TGTGAYTCYGATGT	616
	2 TGTA AACGACGGCCAGT GTRACATGGTGGAAAGRA	CAGGAAACAGCTATGACC <b>A</b> CTTTGRTCAAYATCRTCATT	525
	3 TGTA AACGACGGCCAGT CCTGG <b>C</b> CAYGCAGAYCTCAG	CAGGAAACAGCTATGACC CCAAARCTGAA <b>A</b> GAYGARCT <b>A</b> AT	569
	4 TGTA AACGACGGCCAGT CAGG <b>C</b> AGCTRTTATATTGAAGT	CAGGAAACAGCTATGACC CCTCTAACTGGTTGAYCATGCAAT	613
	5 TGTA AACGACGGCCAGT CCRACWGA <b>G</b> GAACAAGC <b>C</b> GT	CAGGAAACAGCTATGACC GGAGATTTCATCYACTCCCAT	600
	6 TGTA AACGACGGCCAGT AGCAACCCAGRAGATTGRT <b>C</b> CA	CAGGAAACAGCTATGACC TGTGACCA <b>Y</b> TGAATTT <b>V</b> ACA	608
	7 TGTA AACGACGGCCAGT CCAAGYAC <b>V</b> GAGATGTC <b>G</b> CTGAGA	CAGGAAACAGCTATGACC TTRCTCARITTCATTGATGCT	776
	8 TGTA AACGACGGCCAGT CAACACTTATCAATGGATAAT	CAGGAAACAGCTATGACC TAGTAGAAACAAGGTCGTT	711
PB1	1 TGTA AACGACGGCCAGT AGCAAAAGCAGGCAAACCAT	CAGGAAACAGCTATGACC TCTATTAGCCT <b>T</b> CCWGAYTCAIT	554
	2 TGTA AACGACGGCCAGT CAGCTCAACCCRATTGATGGGCCACT	CAGGAAACAGCTATGACC GTTCAAGCTTTTCRC <b>A</b> WATG	646
	3 TGTA AACGACGGCCAGT ACAAGRGT <b>A</b> GATAA <b>C</b> TRAC	CAGGAAACAGCTATGACC CTGAACCA <b>Y</b> TCGGYTGATTT	689
	4 TGTA AACGACGGCCAGT TAA <b>A</b> TACRATGACCAARGA	CAGGAAACAGCTATGACC TTGAACATGCCATCATCATYCCAGG	604
	5 TGTA AACGACGGCCAGT AATCAAAAYCCTMGAATGTT	CAGGAAACAGCTATGACC AGCTCCATGCTRAAAT <b>T</b> RGC	629
	6 TGTA AACGACGGCCAGT CAAATACC <b>A</b> GCAGARATGCTAGC	CAGGAAACAGCTATGACC CCAAGRTCA <b>T</b> TGTTATCAT	557
	7 TGTA AACGACGGCCAGT ATGAGYAAAAAGAGTCYTA	CAGGAAACAGCTATGACC TCAATYTCYTTATG <b>R</b> CTGAC	521
	8 TGTA AACGACGGCCAGT GCYAATTTYAGCATGGAGCT	CAGGAAACAGCTATGACC AGTAGAAACAAGGCATTT	848
PA	1 TGTA AACGACGGCCAGT AGCAAAAGCAGGTACTGAT	CAGGAAACAGCTATGACC TAGTCSGC <b>T</b> TTGGTGGCCATYTC	542
	2 TGTA AACGACGGCCAGT CC <b>G</b> AATGCCT <b>D</b> TTGAARCA <b>C</b> GATT	CAGGAAACAGCTATGACC TG <b>G</b> AAAGCTTGCCCTCAATG	578
	3 TGTA AACGACGGCCAGT TATGAYTACAARGAGAA	CAGGAAACAGCTATGACC GG <b>C</b> TCTTTCCA <b>G</b> CCAAAGAATG <b>T</b> C	668
	4 TGTA AACGACGGCCAGT TGCMTTGARAA <b>C</b> TTAGRG <b>C</b> CTA	CAGGAAACAGCTATGACC TCRCAKGCC <b>T</b> ATTGAAT <b>T</b> TCATT	611
	5 TGTA AACGACGGCCAGT AAATTRAGTATTGARGAYCCG	CAGGAAACAGCTATGACC T <b>H</b> AGTCTYGGGTCA <b>G</b> TGAG	770
	6 TGTA AACGACGGCCAGT TGTGGAGACCTTAAACAGTATGA	CAGGAAACAGCTATGACC TCCGATTGGCCATGTTTCCGAT	745
	7 TGTA AACGACGGCCAGT AATGCATCCTGTGCAGC <b>C</b> ATGGA	CAGGAAACAGCTATGACC TTGTCC <b>T</b> AA <b>G</b> WCC <b>T</b> GAACAA	650
	8 TGTA AACGACGGCCAGT ATGAARTGGGG <b>C</b> ATGGAGATGAG	CAGGAAACAGCTATGACC AGTAGAAACAAGGTACCTTTT	523
HA	1 TGTA AACGACGGCCAGT ATACGACTAGCAAAGCAGGGG	CAGGAAACAGCTATGACC TCATGATTGGGCCAYGA	504
	2 TGTA AACGACGGCCAGT ACRTGTTACCC <b>A</b> GGRGATTTC-	CAGGAAACAGCTATGACC GAAAKGGAGRCTGGTGTTTA	649
	3 TGTA AACGACGGCCAGT ATGARARCTRAGAGAGCA	CAGGAAACAGCTATGACC TCTTACCYACTRGTGTGA	931
	4 TGTA AACGACGGCCAGT AGRATGRAC <b>T</b> ATTACTGGAC	CAGGAAACAGCTATGACC TTC <b>G</b> KATT <b>R</b> TAWGTCCAA	633
	5 TGTA AACGACGGCCAGT TGGATGGTAYGGTTAYCAYCA	CAGGAAACAGCTATGACC TCATAAGTYCCATTTYTA	453
	6 TGTA AACGACGGCCAGT AAGATGAAYACRCARTTCACAG	CAGGAAACAGCTATGACC GTGTCAGTAGAAACAAGGGTGTTT	583
NP	1 TGTA AACGACGGCCAGT CAGGGTAGATAATCACTCAC	CAGGAAACAGCTATGACC AGAGCACATYCTGGGATCCAT	568
	2 TGTA AACGACGGCCAGT ATGGTRCTTCTGCTTTTGATGA	CAGGAAACAGCTATGACC T <b>C</b> TGGCAGCTGTTTGAAATTYCCTTT	547
	3 TGTA AACGACGGCCAGT TGGCATTCHAA <b>C</b> CTRAATGAT	CAGGAAACAGCTATGACC T <b>T</b> GRCTCTTG <b>T</b> G <b>A</b> CGDGG	603
	4 TGTA AACGACGGCCAGT GCTGCGGTGAARGGART	CAGGAAACAGCTATGACCAGCRAT <b>C</b> TG <b>G</b> ACYCCTCT <b>T</b> GT	595
	5 TGTA AACGACGGCCAGT TTCTGAGRGRTCA <b>G</b> TGCA <b>C</b>	CAGGAAACAGCTATGACC AGTAGAAACAAGGGTATTTTTC	763
NA	1 TGTA AACGACGGCCAGT AGCAAAAGCAGGAGT	CAGGAAACAGCTATGACC CTGG <b>G</b> CCRGAAATTC	651
	2 TGTA AACGACGGCCAGT TACA <b>G</b> TAAAGACAAYAG-	CAGGAAACAGCTATGACC GG <b>K</b> CCATCGGTCA <b>T</b> CA <b>A</b>	476 799
	3 TGTA AACGACGGCCAGT GGTCAAGTGGCTTGTCATGA	CAGGAAACAGCTATGACC CATATYTG <b>A</b> ATGAA <b>Y</b> CC	561
	4 TGTA AACGACGGCCAGT AATGGRCARGCCTCRACAA	CAGGAAACAGCTATGACC GCTGCTYCC <b>R</b> CTAGTCCAGAT	621 733
	5 TGTA AACGACGGCCAGT TAGGATACATATGCA <b>G</b> TGG	CAGGAAACAGCTATGACC AGTAGAAACAAGGAG	534
M	1 TGTA AACGACGGCCAGT AGCAAAAGCAGGTAG	CAGGAAACAGCTATGACC GCAATCTGYTCACA <b>A</b> GT	525
	2 TGTA AACGACGGCCAGT CACCGTGCCAGTGAGCG	CAGGAAACAGCTATGACC TCAYTTGAAYCGYTGAT	598
	3 TGTA AACGACGGCCAGT TC <b>A</b> GCTGGWGCAC <b>T</b> TGCCAGTTG	CAGGAAACAGCTATGACC AGTAGMAACAAGGTAGT	681
NS	1 TGTA AACGACGGCCAGT AGCAAAAGCAGGGTGACAA <b>R</b> ACA	CAGGAAACAGCTATGACC TC <b>A</b> GTGAAAGCCCTTA	517
	2 TGTA AACGACGGCCAGT <b>C</b> GAG <b>A</b> CWYTTA <b>G</b> AATGAC <b>A</b>	CAGGAAACAGCTATGACC AGTAGAAACAAGGGTGTTT <b>T</b> TAT	679
	3 TGTA AACGACGGCCAGT AAAGCDAAYTTCAGTGTA	CAGGAAACAGCTATGACC TTCA <b>A</b> THA <b>A</b> CC <b>A</b> CCTTA	361
M13	TGTA AACGACGGCCAGT	CAGGAAACAGCTATGACC	

As bases nucleotídicas destacadas a negrito foram adaptadas das originalmente descritas no protocolo disponibilizado pela OMS [99]. A cinzeno estão representados os *primers*/fragmentos não utilizados após a otimização do protocolo de sequenciação. Bases nucleotídicas: A – Adenina, C – Citosina, T – Timina, G – Guanina. Bases nucleotídicas degeneradas: R – A/G, Y – C/T, S – G/C, W – A/T, K – G/T, M – A/C, D – A/G/T, H – A/C/T, V – A/C/G. – Base nucleotídica removida.

**Tabela IV** – Condições da reacção de RT-PCR e de sequenciação cíclica do protocolo de sequenciação da variante A(H1N1)pdm09. Adaptado do protocolo disponibilizado pela OMS [99].

Mistura de reacção			Condições de incubação		
Reagente	Volume (µl)		Fase	RT-PCR	Seq. Cíclica
	RT-PCR	Seq. Cíclica			
Mastermix	7,5	0,5	Transcrição reversa	45 m a 48°C	-
Primer Forward <sup>1</sup>	1,5	1	Desnaturação inicial	2 m a 94°C	4 m a 96°C
Primer Reverse <sup>1</sup>	1,5	1	Reacção da Polimerase em cadeia	30 ciclos	30 ciclos
Água	2,5	8	Desnaturação	20 s a 94°C	10 s a 96°C
RNA/DNA	2	0,5	Hibridação	30 s a 50°C	5 s a 50°C
AMV	0,3		Extensão	1 m a 72°C	4 m a 60°C
			Extensão final	7 m a 72°C	8 m a 60°C

1 – volumes para uma concentração de primers a 10 µM e 3,2 µM para a reacção de RT-PCR e de sequenciação cíclica, respectivamente.

Após a purificação dos fragmentos amplificados, cada fragmento foi submetido à reacção de sequenciação cíclica utilizando o reagente *Big Dye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Califórnia, EUA) e os *primers* universais M13 *forward* e *reverse* (em reacções separadas) com as seguintes condições de sequenciação cíclica: desnaturação a 96°C durante 4 minutos, 30 ciclos de amplificação com desnaturação a 96°C durante 10 segundos, hibridação a 50°C durante 5 segundos e extensão a 60°C durante 4 minutos, e uma extensão final a 60°C durante 8 minutos (Tabela IV).

O produto da reacção de sequenciação cíclica foi purificado através da utilização do kit comercial *DyeEx<sup>®</sup> 96 plate* (QIAGEN) e a electroforese realizada no sequenciador *ABI PRISM 3130xl Genetic Analyser* (Applied Biosystems). A edição das sequências obtidas foi realizada com o software de edição de sequências *Sequencing Analysis 5.3.1* (Applied Biosystems). A purificação do produto da reacção de sequenciação cíclica, e electroforese capilar e a edição das sequências foi realizada pela Unidade de Tecnologia e Inovação do Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (UTI-INSA).

### 3.2.3 Análise das sequências

Os ficheiros recebidos da UTI-INSA foram inicialmente analisados recorrendo ao software de análise de sequências *Sequence Scanner V1.0* (Applied Biosystems). Nesta primeira análise foi apenas verificada a qualidade de cada reacção no que diz respeito à definição e tamanho da sequência produzida assim como a co-sequenciação de produtos inespecíficos. As sequências referentes à

mesma estirpe/gene foram posteriormente analisadas no programa *Seqman* (Lasergene v7.0.0, DNASTAR) para construir o *contig*<sup>1</sup> do respectivo gene.

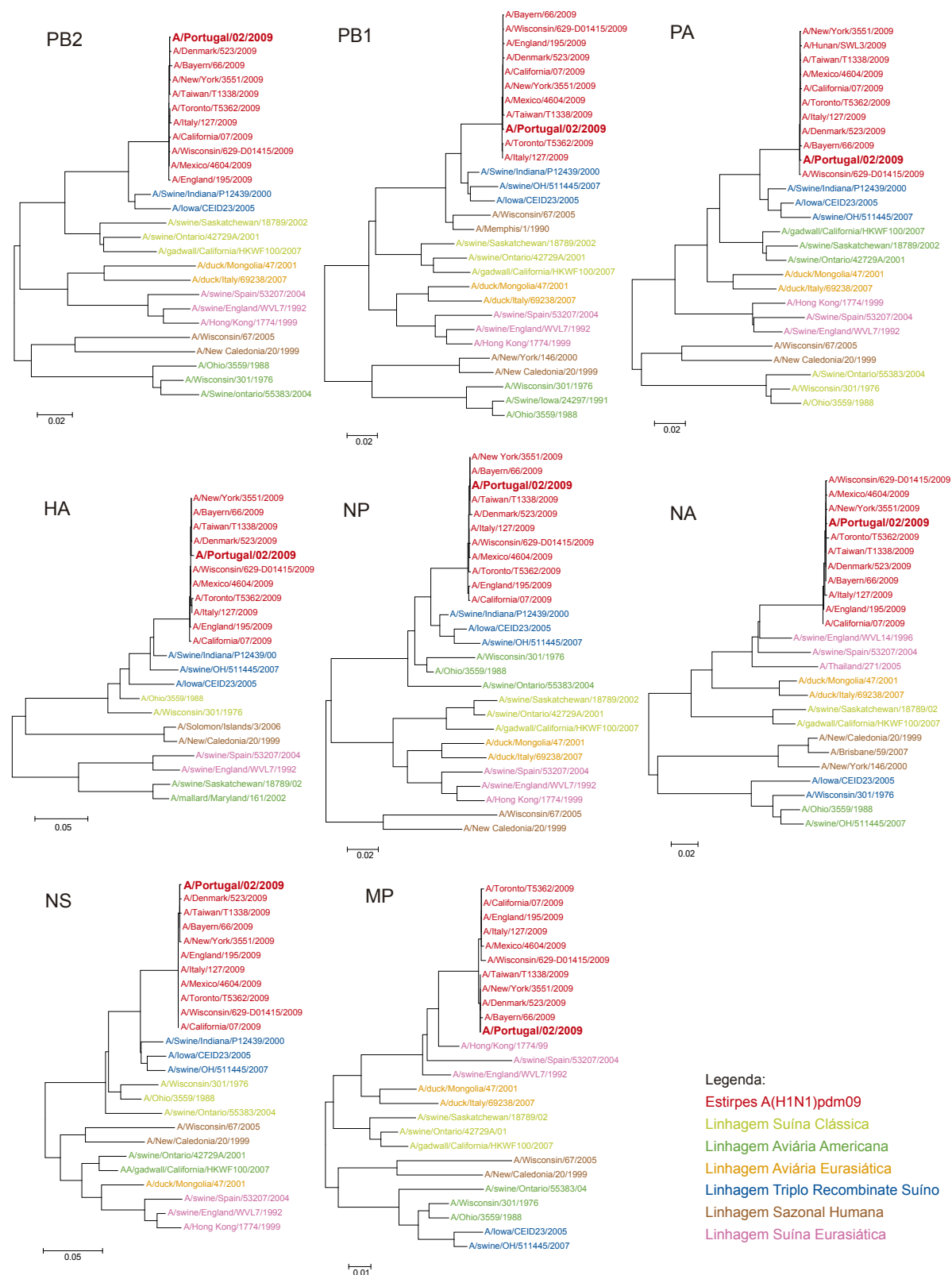
Para cada segmento de genoma viral da estirpe A/Portugal/02/2009 em estudo procedeu-se ao alinhamento da sequência obtida com sequências de estirpes de vírus influenza A(H1N1)pdm09 escolhidas aleatoriamente no espaço e no tempo e com sequências de estirpes pertencentes a várias linhagens do vírus influenza (linhagem humana sazonal; aviária americana e eurasiática; suína clássica, eurasiática e americana e a do triplo recombinante surgido na época de 90) com objectivo de verificar a proximidade genética das sequências da estirpe A(H1N1)pdm09 portuguesa com a sequência das estirpes da variante A(H1N1)pdm09 internacionais e das estirpes representativas das linhagens que deram origem a esta nova variante. Estas sequências foram extraídas da base de dados *NCBI Influenza Virus Resource* [101] e os respectivos números de acesso encontram-se disponíveis no ANEXO B.

Com base nos alinhamentos efectuados foram construídas árvores filogenéticas através do método *Neighbor-Joining*, com o modelo de substituição nucleotídica *Tamura-Nei* recorrendo ao software MEGA V.4.1. [102]. Todas as mutações detectadas nas sequências da estirpe A/Portugal/02/2009 foram descritas tendo como referência a sequência da estirpe vacinal A/California/07/2009.

A análise das sequências obtidas para a estirpe A/Portugal/02/2009 permitiu verificar que o genoma completo desta primeira estirpe A(H1N1)pdm09 analisada a nível nacional é geneticamente idêntico às identificadas a nível internacional, traduzido pelo alinhamento de cada segmento genético desta estirpe com os segmentos correspondentes das restantes estirpes A(H1N1)pdm09 incluídas na análise. Nas árvores filogenéticas é ainda possível observar a proximidade dos segmentos genéticos da variante A(H1N1)pdm09 com os segmentos genéticos das linhagens que deram origem ao vírus pandémico (Figura 9) [19, 103].

---

<sup>1</sup> Termo utilizado em biologia molecular que representa a sequência consenso de DNA obtida pela sobreposição de fragmentos de DNA obtidos individualmente.

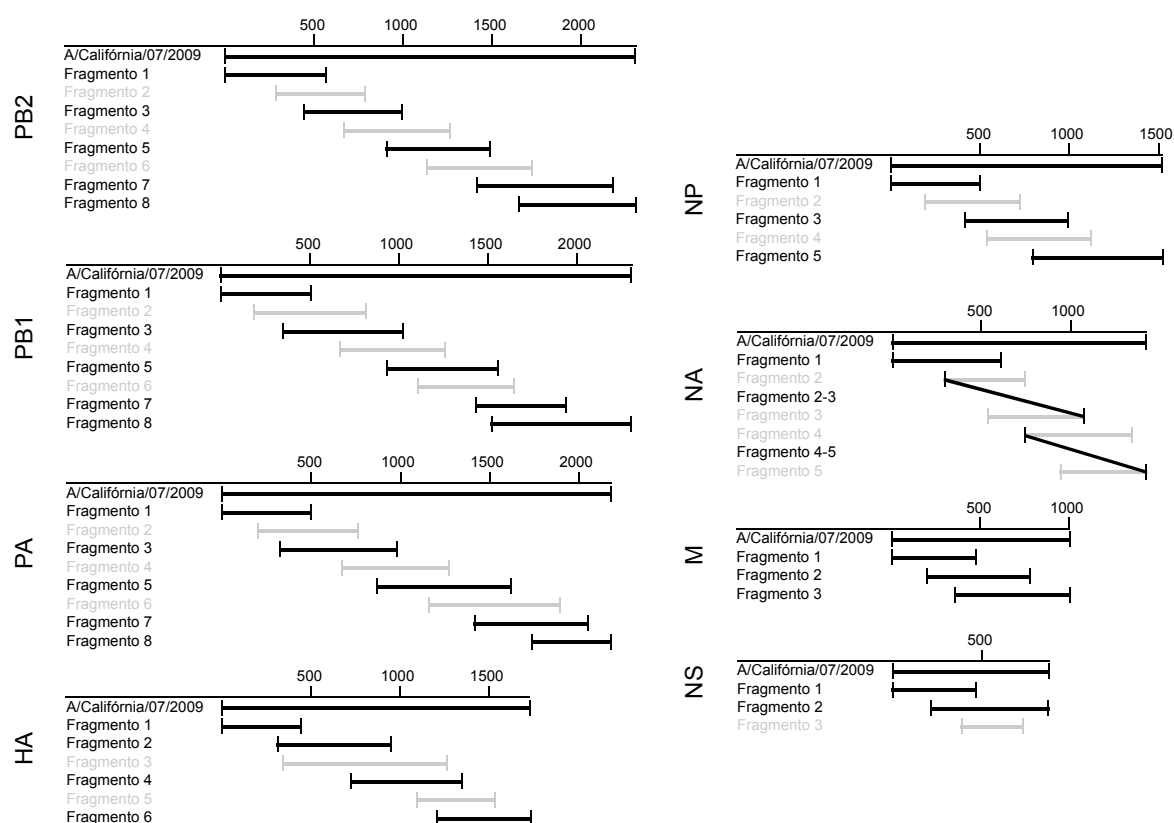


**Figura 9** – Árvores filogenéticas do alinhamento das sequências de cada segmento genético da estirpe A/Portugal/02/2009 com sequências dos segmentos genéticos de várias estirpes da variante A(H1N1)pdm09 e com sequências dos segmentos genéticos de estirpes pertencentes a várias linhagens do vírus influenza. As árvores filogenéticas foram construídas usando o método *Neighbor Joining* com o modelo de substituição nucleotídica *Tamura-Nei*. Adaptado de Santos *et al.*, 2010 [19]

### 3.2.4 Optimização do protocolo de sequenciação

Após a primeira aplicação do protocolo de sequenciação do genoma da variante pandémica A(H1N1)pdm09 verificou-se a necessidade de o optimizar de forma a que a sua aplicação se tornasse mais eficaz em termos de rapidez na produção de resultados e custo económico.

Na estratégia de sequenciação verificou-se (1) uma elevada sobreposição de fragmentos amplificados, (2) que todos os fragmentos eram correctamente amplificados e sem a presença de bandas inespecíficas, e (3) que a resolução dos electroferogramas resultantes da sequenciação permitia uma boa leitura das bases nucleotídicas até aos 600-700 pb. Assim, foi possível na maioria dos segmentos genéticos descartar a amplificação e sequenciação de alguns fragmentos intermédios (Figura 10 a cinzento). Na sequenciação do gene da NA foi ainda possível combinar o *primer forward* do fragmento 2 com o *reverse* do fragmento 3 e o *primer forward* do fragmento 4 com o *reverse* do fragmento 5, permitindo a amplificação de apenas 3 fragmentos para sequenciar todo o segmento (Figura 10).



**Figura 10** – Representação esquemática da estratégia de sequenciação optimizada para as estirpes da variante pandémica A(H1N1)pdm09. A cinzento estão representados os fragmentos eliminados.

A optimização deste protocolo permitiu reduzir o número de reacções de RT-PCR e de sequenciação cíclica necessárias para obter o genoma de uma estirpe de 46 reacções de RT-PCR para 30, e de 92 reacções de sequenciação cíclica para 60. No entanto, recorreu-se à amplificação de outros fragmentos genéticos sempre que surgiram dúvidas nas sequências obtidas por aplicação do protocolo optimizado, nomeadamente para confirmação da presença de mutações ou na resolução de picos mistos no eletroferograma que poderiam comprometer a qualidade dos resultados.

### **3.3 Sequenciação dos genes das glicoproteínas de superfície e da proteína não estrutural NS1**

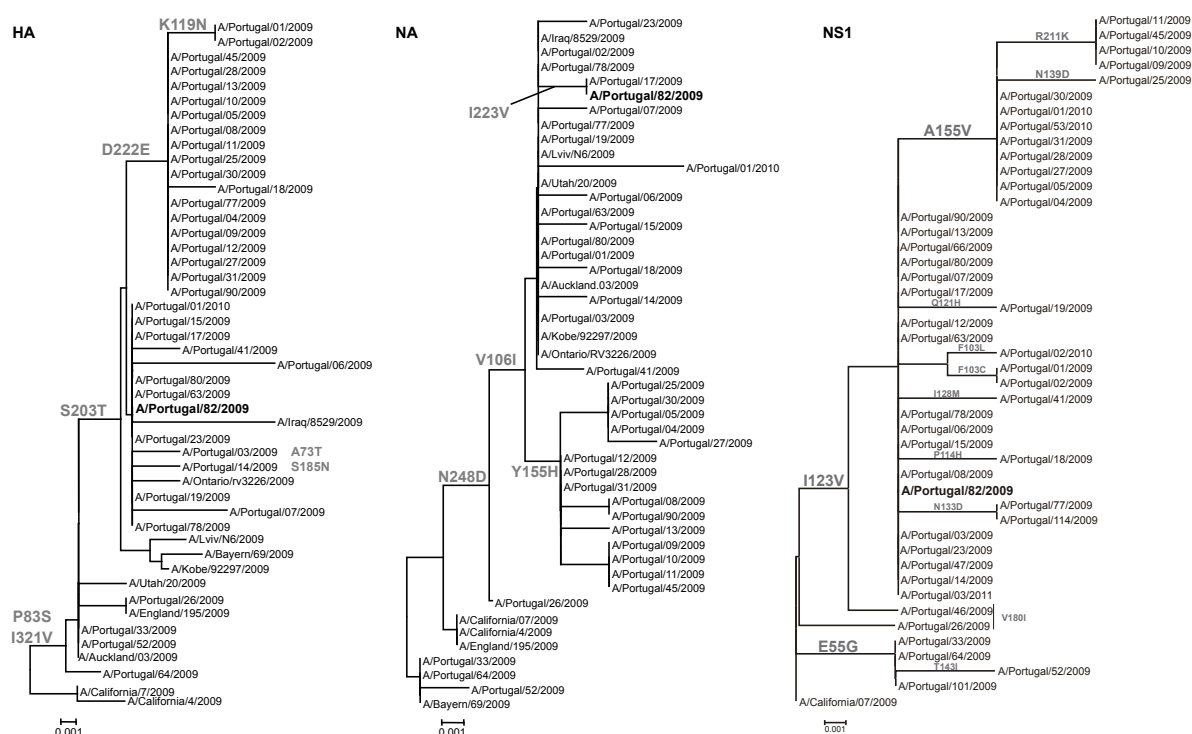
No processo de adaptação de um vírus pandémico de transmissão zoonótica ao novo hospedeiro humano é natural ocorrerem mutações que melhorem o *fitness* viral. Quando estas mutações surgem nos principais antígenos de superfície, HA e NA, podem ter um impacto importante na prevenção e controlo da pandemia uma vez que podem contribuir para a redução da eficácia da vacinação contra a nova estirpe e no sucesso da utilização de antivirais específicos inibidores da neuraminidase, tanto no tratamento dos doentes como na profilaxia. Torna-se, assim, fundamental uma monitorização constante e sistemática destas mutações.

Após a implementação do protocolo de sequenciação para a nova variante A(H1N1)pdm09 foi necessário proceder ao estudo do *background* genético das proteínas antigénicas, HA e NA, das estirpes portuguesas de forma a detectar possíveis discrepâncias antigénicas relativamente à estirpe vacinal A/California/07/2009, assim como para detectar a presença de possíveis marcadores moleculares de resistência aos antivirais. Foi ainda incluída a sequenciação do gene da proteína NS1, normalmente associada à inibição do processo apoptótico das células infectadas, por interferir com a subunidade p85β do PI3K [70]. Assim, foram sequenciadas a subunidade HA1 do gene HA, a NA e a NS1, num total de 37 estirpes de vírus influenza da variante pandémica A(H1N1)pdm09, utilizando o protocolo optimizado e descrito no ponto 3.2.

No domínio HA1 da HA, todas as sequências analisadas apresentaram as mutações P83S e I321V. Trinta e três apresentaram ainda a mutação S203T e, destas, 19 apresentaram a mutação D222E (Figura 11). É importante referir que esta última mutação ocorre no local de ligação da HA1 aos receptores celulares [104, 105]. Foram ainda detectadas pontualmente as mutações A73T e S185N nos locais antigénicos Cb e Sb, e a mutação K119N que origina um motivo N-X-S associado a potenciais locais de N-glicosilação [105, 106]. Apesar destas mutações ocorrerem em locais críticos

da subunidade HA1 da hemaglutinina, não foi descrita nenhuma implicação destas mutações na diminuição da resposta imunológica que afectasse a efectividade da vacina antigripal.

Relativamente à NA, 34 estirpes apresentaram as mutações N248D e V106I. Quinze apresentaram adicionalmente a mutação Y155H e duas apresentaram a mutação I223V (Figura 11). As estirpes com a mutação I223V apresentaram uma susceptibilidade reduzida aos inibidores da neuraminidase, o que está de acordo com o descrito na bibliografia [107, 108].



**Figura 11** – Árvores filogenéticas do alinhamento das sequências dos genes HA, NA e NS1 das estirpes isoladas em Portugal da variante pandémica do vírus A(H1N1)pdm09. As árvores filogenéticas foram construídas usando o método Neighbor Joining com o modelo de substituição nucleotídica Tamura-Nei. A negrito está assinalada a estirpe seleccionada como representativa da linhagem A(H1N1)pdm09 a ser utilizada neste trabalho, após o estudo do genoma completo. Adaptado de Santos *et al.*, 2011 e Gíria *et al.*, 2012 [105, 108]

Na maioria das estirpes analisadas o gene que codifica a proteína NS1 apresentava as mutações I123V e A155V, tendo ainda sido detectadas outras mutações pontuais. De entre estas, destaca-se a mutação N139D na estirpe A/Portugal/25/2009 por ocorrer no sítio de interacção da NS1 com o p85 $\beta$ , ligação responsável pela inibição da apoptose na fase inicial da infecção. Note-se, contudo, que apenas as mutações nos aminoácidos 140 e 141 foram descritas na bibliografia como tendo capacidade para alterar a interacção NS1- p85 $\beta$  [109].



### 3.4 Sequenciação do genoma completo

Com o objectivo de verificar a variabilidade genética das estirpes nacionais ao nível dos genes internos, procedeu-se à sequenciação do restante genoma de 12 das 37 estirpes para as quais se analisaram os genes das glicoproteínas de superfície. A maioria das mutações detectadas nos genes internos mostraram uma variabilidade genética semelhante à maioria das estirpes globais, apresentando a assinatura genética do *clade* 7 definida por Nelson *et al.*, 2009 [110]. Este *clade* é caracterizado pela presença das mutações S220T na HA, V106I e N248D na NA, V100I na NP e I123V na NS1 [110]. Foram ainda detectadas as mutações R54K e I354V no gene da PB2 e a mutação L122Q no gene da NP, também já descritas como presentes em estirpes de outros países [111, 112].

Foram detectadas outras mutações pontuais, mas não se encontrou descrito na bibliografia qualquer referência ao seu impacto no *fitness* viral (Tabela V).

Com o estudo da variabilidade genética do genoma das estirpes nacionais da nova variante do vírus influenza do A(H1N1)pdm09, verificou-se que a variabilidade genética das estirpes nacionais é semelhante à observada a nível global.

**Tabela V** – Mutações detectadas nos genes que codificam as proteínas do restante genoma de 13 estirpes portuguesas. As mutações são descritas utilizando como referência a sequência da estirpe vaccinal A/California/07/2009. Adaptado de Santos *et al.* 2010 e Gira *et al.* 2012 [19, 108]

Estirpe	Proteína						
	PB2	PB1	PA	NP	NS2/NEP	M1	M2
A/Portugal/02/2009	-	-	<b>P224S</b>	<b>V100I; L122Q</b>	-	-	-
A/Portugal/06/2009	E191K	-	<b>P224S</b> ; Q193K; P400L	<b>V100I; L122Q</b>	-	-	-
A/Portugal/07/2009	-	S633G	<b>P224S</b>	<b>V100I; L122Q</b>	-	-	-
A/Portugal/08/2009	<b>R54K</b> ; I463M	-	<b>P224S</b> ; D347N; M561I	<b>V100I; L122Q</b>	-	-	-
A/Portugal/09/2009	<b>R54K; I354V</b>	S384L	<b>P224S</b> ; D347N	<b>V100I; L122Q</b>	D54N	-	-
A/Portugal/10/2009	<b>R54K</b>	S384L	<b>P224S</b> ; D347N	<b>V100I; L122Q</b>	D54N; G22E	-	-
A/Portugal/11/2009	<b>R54K</b> ; E249G	S384L	<b>P224S</b> ; D347N	<b>V100I; L122Q</b>	D54N	-	-
A/Portugal/12/2009	<b>R54K</b>	-	<b>P224S</b> ; S364N; N614S	<b>V100I; L122Q</b>	-	-	-
A/Portugal/13/2009	<b>R54K</b>	S384L	<b>P224S</b> ; D347N; C95G; N409S	<b>V100I; L122Q</b>	S93G	-	-
A/Portugal/17/2009	V480I	-	<b>P224S</b>	<b>V100I; L122Q</b>	-	-	-
A/Portugal/18/2009	-	-	<b>P224S</b> ; S296N	<b>V100I; L122Q</b>	-	-	-
A/Portugal/82/2009	V480I; D680E	-	<b>P224S</b>	<b>V100I; L122Q</b> ; K400R	-	-	-
A/Portugal/01/2010	K340N	S678N	<b>P224S</b> ; I94L; N675H	<b>V100I; L122Q</b> ; V217I; V313I	-	-	-

**Negrito** – Mutações que representam variações das estirpes A(H1N1)pdm09 já descritas na literatura[110-112]

A optimização de um protocolo de sequenciação da nova variante A(H1N1)pdm09 e o estudo genético associado a esta optimização criaram a ferramenta e informação necessária para se poder seleccionar uma estirpe representativa desta variante a ser utilizada nos estudos comparativos de indução da apoptose por vírus influenza do tipo A e do tipo B.

## **4 Desenvolvimento experimental conducente ao estudo da apoptose nos vírus influenza**

A biblioteca de genes construída neste capítulo permitiu a publicação do artigo:

- Gíria M, **Santos L**, Louro J, Rebelo de Andrade H. *Reverse genetics vaccine seeds for influenza: Proof of concept in the source of PB1 as a determinant factor in virus growth and antigen yield*. Virology, 2016. 496:21-7;

A maioria da metodologia descrita neste capítulo foi executada pelo autor da tese, Luis André Santos. A manutenção da linha celular MDCK-SIAT1 foi dividida entre o autor da tese, a Dra. Vanessa Correia e o Mestre João Louro.

#### **4.1 Resumo**

Para assegurar a uniformização de todos os ensaios efectuados no estudo do efeito do vírus influenza na indução da apoptose das células infectadas, foi necessário criar um stock de cada estirpe viral incluída no estudo de modo a garantir que o ponto de partida para cada ensaio fosse o menos variável possível. Assim, para este trabalho foi necessário seleccionar uma estirpe representativa dos vírus influenza do tipo A e uma representativa dos vírus influenza do tipo B, propagá-las, constituir um stock com volume suficiente para todos os ensaios previstos e, por fim, titular a carga viral de cada stock de modo a ser utilizada a mesma dose infecciosa em todos os ensaios. Para a titulação dos stocks virais tentou-se implementar e aferir várias técnicas, tendo-se conseguido titular ambos os stocks virais apenas com a técnica de TCID<sub>50</sub>.

Para o estudo do efeito dos vários componentes virais na indução/inibição da apoptose, foi necessário constituir uma biblioteca dos segmentos genéticos de cada stock clonados em plasmídeos de expressão bidireccionais. A construção da biblioteca de genes foi efectuada recorrendo a uma metodologia desenvolvida e otimizada a partir de um protocolo inicial cedido pelo CDC. O protocolo aplicado apenas permitiu a clonagem dos genes NS e M, para os restantes genes foi necessária uma optimização (1) da reacção de amplificação e (2) da metodologia de clonagem utilizada para genes que continham na sua sequência a sequência reconhecida pela enzima de restrição *SapI*. Por fim, a recuperação de vírus a partir da transfecção de células com os 8 plasmídeos de cada estirpe permitiu confirmar a viabilidade dos plasmídeos de expressão bidireccionais construídos.

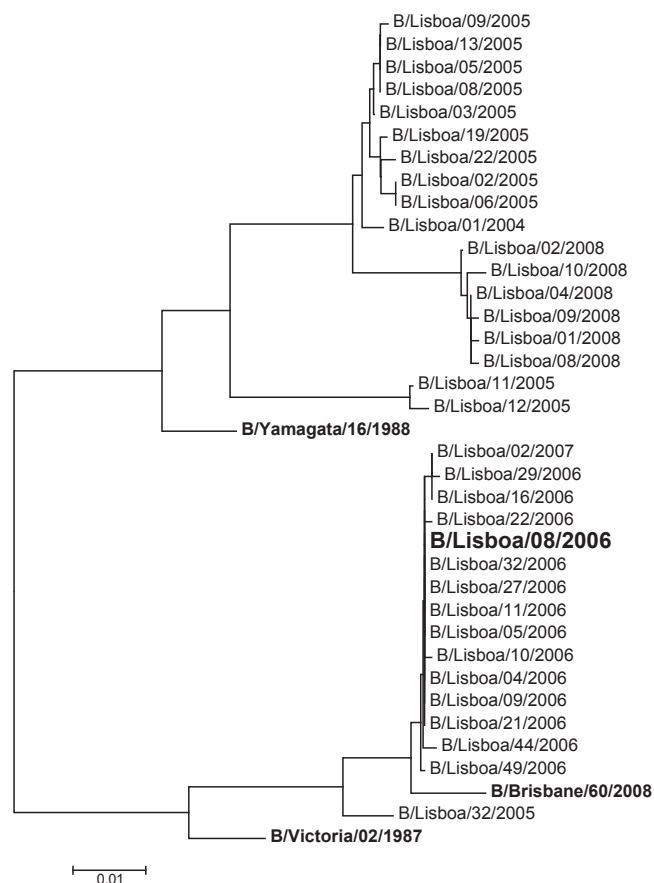
#### **4.2 Selecção de estirpes**

Para este trabalho foram seleccionadas duas estirpes de vírus influenza, uma do tipo A e outra do tipo B. Para a selecção da estirpe do tipo A, num contexto de emergência de uma variante pandémica (que posteriormente se estabeleceu como uma variante sazonal, responsável pelas epidemias gripais dos invernos subsequentes), a falta de informação do impacto no hospedeiro e do controlo sobre a apoptose nas células infectadas, decidiu-se seleccionar uma estirpe pertencente à variante A(H1N1)pdm09 para ser incorporada nos estudos subsequentes deste trabalho.

Durante a optimização do protocolo de sequenciação das estirpes da nova variante A(H1N1)pdm09 com a estirpe A/Portugal/02/2009 verificou-se que esta estirpe apresenta a mutação F103C no gene da NS1, para além de não ser uma mutação representativa da variabilidade genética observada nas estirpes da nova variante (nacionais e globais), esta mutação ocorre no local de interacção da NS1 com o CPSF30, interacção que inibe a resposta celular à infecção levando a um aumento da virulência e da replicação viral [113, 114]. Assim, foi necessário seleccionar outra estirpe desta variante. Tendo em conta a caracterização genética, feita anteriormente, foi seleccionada a estirpe A/Portugal/82/2009 por ser representativa da variação genética observada nas estirpes circulantes a nível nacional e global e, como observado no ponto 3.4, por fazer parte do grupo de estirpes com uma assinatura genética característica do *clade* 7 definido por Nelson *et al.*, 2009 [110].

No caso da estirpe seleccionada para representar os vírus influenza do tipo B, optou-se por seleccionar uma estirpe do tipo B da linhagem B/Victoria, linhagem aconselhada pela OMS para ser incluída na vacina trivalente da época 2009/2010 (altura em que foram seleccionadas as estirpes a incluir neste estudo) [115]. Assim, foi feita uma análise filogenética das sequências de estirpes de vírus influenza do tipo B presentes no biobanco de amostras do Laboratório de Resistência aos Antivirais do INSA. As sequências foram alinhadas com as sequências da estirpe vaccinal (2009/2010) B/Brisbane/60/2008 (CY115151) e com as duas estirpes de referência representantes de cada linhagem, B/Victoria/02/1987 e B/Yamagata/16/1988 (CY018757 e CY018765, respectivamente) utilizando o método de alinhamento *ClustalW* no software MEGA V.4.1 [102]. Com base no alinhamento efectuado foi construída uma árvore filogenética através do método *Neighbor-Joining*, com o modelo de substituição nucleotídica *Tamura-Nei* recorrendo ao software MEGA V.4.1 [102].

A análise da árvore filogenética mostrou que as estirpes da época 2006/2007 eram geneticamente semelhantes à estirpe vacinal B/Brisbane/60/2008, tendo-se assim optado pela selecção duma destas estirpes (B/Lisboa/08/2006) para constituir o stock referente ao vírus influenza do tipo B utilizado neste trabalho (Figura 12).



**Figura 12** – Árvore filogenética do alinhamento das sequências da subunidade HA1 do gene da HA das estirpes de vírus influenza do tipo B presentes no biobanco do Laboratório de Resistência aos Antivirais do INSA com as sequências da estirpe vacinal (2009/2010) B/Brisbane/60/2008 e das estirpes referência B/Victoria/02/1987 e B/Yamagata/16/1988 (CY115151, CY018757 e CY018765, respectivamente). A árvore filogenética foi construída utilizando o método *Neighbor Joining* com o modelo de substituição nucleotídica *Tamura-Nei*.

### 4.3 Preparação de stocks virais

A preparação dos stocks virais, das duas estirpes seleccionadas, foi efectuada através de isolamentos em células MDCK-SIAT1, sendo necessário estabelecer e manter esta linha celular em cultura. No ponto abaixo, para além da preparação das células MDCK-SIAT1 para o isolamento dos stocks, são já descritos, igualmente, os procedimentos de preparação de células necessárias para as restantes partes do trabalho (recuperação de vírus através de transfecção com sistema de 8 plasmídeos, ensaios de cinética da apoptose, etc.).

#### 4.3.1 Cultura Celular

Neste trabalho, foram utilizadas duas linhas celulares com procedimentos de propagação distintos: a linha celular MDCK-SIAT1 utilizada para o isolamento dos stocks virais e estudos *in vitro* da

indução/inibição da apoptose pelos vírus influenza e, a linha celular 293T para a recuperação de partículas virais a partir da transfecção destas com plasmídeos com os segmentos genéticos dos vírus.

#### 4.3.1.1 Células MDCK-SIAT1

A linha celular *Madin-Darby canine kidney* (MDCK) é a linha celular recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o isolamento dos vírus influenza [116]. No entanto, Matrosovich *et al.* criaram uma variação desta linha celular transfectando-a com o gene humano *CMP-Nacetylneuraminate beta-galactoside  $\alpha$ -2,6-sialyltransferase* (SIAT1). Esta modificação genética confere às células a capacidade de sobreexpressar os receptores de ligação de ácido siálico na configuração  $\alpha$ -2,6, receptores predominantes no tracto respiratório superior humano, aumentando assim o sucesso do isolamento de vírus influenza na linha celular transfectada comparativamente com células MDCK [117, 118].

Para a utilização da linha celular MDCK-SIAT1 em estudos com o vírus influenza, as células necessitam de uma pré-adaptação pois a presença de soro de feto de bovino (FBS, utilizado no crescimento das células) inibe a replicação viral. Assim, é necessário uma habituação das células à privação de FBS. Para tal, desde que são descongeladas as células MDCK-SIAT1 são propagadas alternando uma fase de crescimento celular com uma fase de manutenção da linha celular. Na fase de manutenção o metabolismo celular é diminuído colocando as células a 30°C na privação de FBS durante um período máximo de 4-5 dias.

Toda a metodologia de manuseamento e continuação de linhas celulares foi efectuada num laboratório classe 2 preparado e utilizado em exclusivo para culturas celulares.

#### *Descongelamento da linha celular*

As células utilizadas neste estudo encontravam-se conservadas em azoto liquido (-196°C) numa passagem baixa. Estas foram descongeladas antecipadamente antes da sua utilização nos estudos efectuados. Para descongelar as células, a ampola contendo as células criopreservadas é colocada em banho de água a 37°C. Assim que o conteúdo da ampola de células se apresenta descongelado é transferido para um tubo *falcon*, o volume de 15 ml é perfeito com meio suplementado (Tabela VI) previamente colocado a 37°C e as células são centrifugadas a 400 x g durante 5 minutos. Este passo



permite a remoção do criopreservante dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, Saint Louis, Missouri, EUA), utilizado para o congelamento das células, que é tóxico para as células a 37°C. Após a remoção do sobrenadante, as células são cuidadosamente ressuspensas em 7 ml de meio de crescimento (Tabela VI), colocadas num frasco de cultura celular T25 e deixadas numa estufa a 37°C até se verificar o total preenchimento da superfície do frasco com a camada celular. O meio de crescimento utilizado no processo de descongelamento contém o antibiótico de selecção sulfato G418 (Geneticina<sup>®</sup>, Gibco - Life Technologies<sup>™</sup>, Paisley, UK), este antibiótico, para além de proteger a linha celular, confere a continuação da linhagem das células transfectadas com o gene SIAT1, pois o plasmídeo que confere a transcrição deste gene confere, igualmente, resistência das células a este antibiótico.

**Tabela VI – Constituição dos diferentes meios utilizados na cultura celular.**

Meio	Reagentes	Concentração final
Suplementado	DMEM (1X)	1X
	L-Glutamina (100X)	1X (2 mM)
	HEPES (1 M)	24 mM
	Aminoácidos não essenciais (100X)	1X
Crescimento	Meio suplementado	-
	Soro fetal bovino	10%
	Geneticina G-418 (50 mg/ml) <sup>1</sup>	1 mg/ml
	PSN (100X) + Fungizona (250 µg/ml) <sup>1</sup>	1X + 2,5 µg/ml
Manutenção	Meio suplementado	-
	Geneticina G-418 (50 mg/ml)	1 mg/ml
Infecção	Meio suplementado	-
	HEPES <sup>2</sup>	0,85 mM
	PSN + Fungizona	1X + 2,5 µg/ml
	Tripsina-TPCK	3 µg/ml

<sup>1</sup>No meio de crescimento para continuação da linha celular é utilizado o antibiótico de selecção Geneticina G-418. No meio de crescimento para preparação de células para infecção é utilizada a mistura de antibióticos PSN e Fungizona

<sup>2</sup>Adicional ao já existente no meio suplementado

#### *Propagação da linha celular - Tripsinização das células*

A passagem das células é efectuada para a continuação da linha celular ou sempre que são necessárias células para infecção. Para a continuação da linha celular, às células que estão em manutenção é removido o meio de manutenção e as células são lavadas duas vezes com DPBS (tampão fosfato salino fórmula Dulbecco, Gibco - Life Technologies<sup>™</sup>) a 37°C de modo a remover todos os produtos do metabolismo celular assim como para remover todas as células mortas ou em suspensão. Para a individualização das células e a sua dissociação do frasco é adicionada tripsina-

EDTA 0,05% (Gibco - Life Technologies™) que após 1 minuto em contacto com as células é removida e as células são colocadas a 37°C até se verificar a completa dissociação destas do frasco. As células tripsinizadas são homogeneizadas e ressuspendidas em meio suplementado e no final é adicionado FBS (Gibco - Life Technologies™) correspondente a 10% do volume final, esta adição de FBS além de parar o efeito tripsina-EDTA vai deixar a suspensão celular com a mesma composição do meio de crescimento.

#### *Propagação da linha celular - Cálculo da concentração celular*

Para o cálculo da concentração celular da suspensão celular resultante da tripsinização das células, é feita uma diluição de 1:1 de 25µl de suspensão celular com 25µl de azul tripiano 4% (Gibco - Life Technologies™) e esta diluição é pipetada para uma câmara de Neubauer. A utilização do azul de tripiano além de criar um campo de contraste vai permitir diferenciar as células viáveis das não viáveis através da sua coloração, pois o azul de tripiano vai penetrar nas células com a membrana celular danificada tornando as células não viáveis azuis e as viáveis sem coloração.

A contagem das células foi efectuada num microscópio óptico de campo invertido onde foram contadas as células viáveis presentes em cada quadrante da câmara de Neubauer. A concentração da suspensão celular foi calculada multiplicando a média das células viáveis dos quatro quadrantes pelo factor de diluição (x 2) e pelo factor da câmara de Neubauer utilizada para a contagem ( $10^4$ ).

#### *Propagação da linha celular - Preparação de células para infecção e para a continuação da linha celular*

A suspensão celular obtida anteriormente pode ser utilizada para a preparação de frascos para a continuação da linha celular ou para a preparação de frascos/tubos/placas para infecção. A única diferença entre a preparação das células para a continuação da linha celular e das células para infecção é o antibiótico utilizado. No primeiro caso é utilizada a Geneticina® para manter a selecção das células transfectadas com o gene SIAT1 enquanto que no segundo caso é utilizada a mistura de antibióticos penicilina, estreptomicina e neomicina (PSN, Gibco - Life Technologies™) e o antifúngico Fungizona (Gibco - Life Technologies™) (Tabela VI).

Para a continuação da linha celular, as células foram semeadas em frascos de cultura celular T75, onde foi calculado o volume de suspensão celular necessária para conter  $3 - 4 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>.

Este volume foi completo até aos 15 ml com meio de crescimento contendo o antibiótico de selecção Geneticina® (Tabela VI), esta mistura foi transferida para o frasco que foi deixado a 37°C até à formação da monocamada celular (cerca de 48h).

A preparação das células para infecção é idêntica às da propagação da linha celular e as condições de propagação encontram-se resumidas na Tabela VII. Neste passo foi utilizado o meio de crescimento com a mistura de antibióticos PSN e o antifúngico Fungizona (Tabela VI).

#### *Manutenção da linha celular*

Como descrito anteriormente a rotina de propagação da linha celular MDCK-SIAT1 intercala uma fase de crescimento celular com uma fase de manutenção o que permite uma adaptação das células à ausência de FBS e uma maior durabilidade da linha celular. Para a manutenção da linha celular, quando as células propagadas para a continuação da linha celular apresentam uma monocamada completa, é removido o meio de crescimento e a camada celular é lavada duas vezes com DPBS a 37°C. Após estas lavagens, são adicionados 15 ml de meio de manutenção (Tabela VI) e as células são colocadas a 30°C. Este passo diminui o metabolismo celular e permite manter as células em monocamada até um máximo de 5 dias.

**Tabela VII –** Condições de crescimento celular para cada tipo de recipiente de cultura utilizado para infecção.

Recipiente	Área de cultivo (cm <sup>2</sup> )	Densidade <sup>1</sup>	Volume total (mL)	Condições de crescimento	Confluência da monocamada
Frasco T25	25	2-4 x 10 <sup>4</sup> células/cm <sup>2</sup>	7	±48h a 37°C	70/90% <sup>2</sup>
Frasco T75	75	3-4 x 10 <sup>4</sup> células/cm <sup>2</sup>	15	±48h a 37°C	90%
Tubo	-	35 x 10 <sup>4</sup> células/tubo	1	±24h a 37°C	100%
Placa 3,5 cm	9,4	2-3 x 10 <sup>4</sup> células/cm <sup>2</sup>	2	±48h a 37°C; 5% CO <sub>2</sub>	70%
Placa de 6 poços	9,3 /poço	2-3 x 10 <sup>4</sup> células/cm <sup>2</sup>	3 /poço	±48h a 37°C; 5% CO <sub>2</sub>	90%
Placa de 96 poços	0,33 /poço	2-3 x 10 <sup>4</sup> células/cm <sup>2</sup>	0,2 /poço	±48h a 37°C; 5% CO <sub>2</sub>	90%

<sup>1</sup>A densidade celular semeada na preparação das células depende sempre da condição e historial de crescimento celular

<sup>2</sup>Nos frascos T25 utilizou-se uma confluência da monocamada de 90% no isolamento dos stocks virais e de 70% nos ensaios de infecção para recuperação das células para extracção de proteínas

#### 4.3.1.2 Células 293T

A linha celular 293T é uma derivação da linha celular HEK293, células embrionárias de rim humano, com uma elevada taxa de sucesso de transfecção. As células 293T (*American Type Culture Collection*, Manassas, Virginia, EUA, gentilmente cedidas pela Doutora Maria José Borrego da Unidade de Investigação e Desenvolvimento do Departamento de Doenças Infecciosas do INSA)

foram utilizadas neste trabalho, devido à sua elevada taxa de transfecção, para a recuperação de partículas virais a partir da transfecção das células com plasmídeos contendo os segmentos genéticos virais.

A rotina de propagação desta linha celular difere da descrita anteriormente. Esta linha celular está constantemente em crescimento não sendo colocada em manutenção. Assim, a propagação desta linha celular é semelhante à descrita anteriormente em que a concentração celular a semear poderá ir das  $1 \times 10^4$  células por  $\text{cm}^2$  até  $4 \times 10^4$  células por  $\text{cm}^2$ , dependendo do tempo idealizado para obtenção da monocamada celular. É utilizada a mistura de antibióticos PSN e o antifúngico fungizona e as células são colocadas a crescer a  $37^\circ\text{C}$  com 5%  $\text{CO}_2$ . No entanto, quando é semeada uma concentração baixa de células, é necessária uma troca de meio de crescimento passados 2-3 dias de modo a prevenir o surgimento de eventual toxicidade para as células.

#### 4.3.1.3 Preparação de células para recuperação de partículas virais a partir de plasmídeos

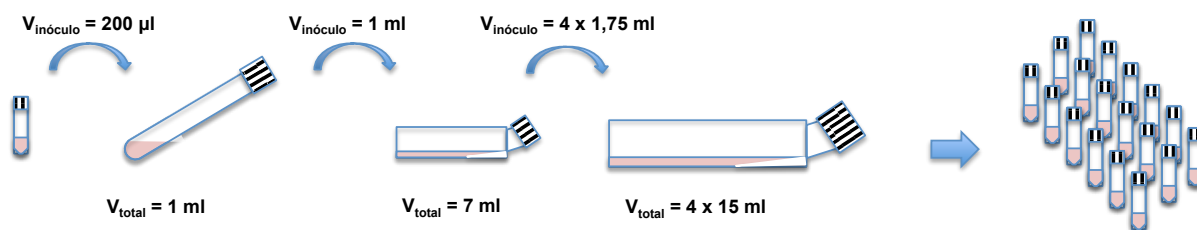
Para a recuperação de partículas virais a partir de plasmídeos é necessário transfectar células com 8 plasmídeos contendo cada um dos segmentos virais. Quando se consegue a transfecção de uma célula com os 8 plasmídeos contendo os diferentes genes do vírus influenza, ocorre a transcrição de todas as proteínas virais necessárias para a obtenção de partículas virais funcionais que se vão libertar e infectar as restantes células. A linha celular MDCK-SIAT1 apresenta uma taxa de transfecção inferior a 30% (informação do fabricante para a linha celular MDCK), tornando muito baixa a probabilidade de uma mesma célula ser transfectada com os 8 diferentes plasmídeos ao mesmo tempo, por este motivo neste trabalho foi utilizada a linha celular 293T. No entanto, a linha celular 293T não apresenta receptores compatíveis com o vírus influenza impedindo que as partículas virais originadas na transfecção infectem as células vizinhas e se propaguem. Assim neste contexto, foi utilizada uma co-cultura destas duas linhas celulares de modo a que se concilie a elevada taxa de transfecção das células 293T para a montagem das partículas virais funcionais e a replicação destas partículas virais nas células MDCK-SIAT1.

Para a preparação de uma co-cultura MDCK-SIAT1/293T seguiram-se os procedimentos descritos anteriormente para se obter uma suspensão celular de células MDCK-SIAT1 e uma suspensão celular de células 293T. Após o cálculo da concentração celular de cada suspensão, foram semeadas  $2 \times 10^4$  células / $\text{cm}^2$  de cada linha celular em placas CT de 6 poços com meio de

crescimento contendo a mistura de antibióticos PSN e o antifúngico fungizona (Tabela VI e Tabela VII). A placa foi deixada a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> até a obtenção de uma monocamada celular com cerca de 90% de confluência.

#### **4.3.2 Isolamento dos stocks virais**

Para a constituição dos stocks virais foi necessário produzir um volume elevado de cada vírus stock a partir das estirpes isoladas presentes no biobanco referido anteriormente. Para tal, tubos contendo células MDCK-SIAT1 foram preparados como descrito no ponto 4.3.1, 24h antes da infecção. Para a infecção, foi removido o meio de crescimento do tubo contendo as células que foram cuidadosamente lavadas com 1 ml de meio suplementado a 37°C. Após as lavagens, foram adicionados 200 µl da estirpe a isolar e as células foram colocadas à temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir a adsorção do vírus às células. No final do período de adsorção, foi adicionado 1 ml de meio de infecção (Tabela VI) e os tubos foram colocados a 35°C. Os tubos inoculados foram observados diariamente ao microscópio óptico de campo invertido para observar a destruição celular. Quando se observou a total destruição da camada celular procedeu-se à confirmação do crescimento viral através da reacção de hemaglutinação (ponto 4.3.2.1). Após a confirmação do crescimento viral em tubo, procedeu-se à inoculação do volume obtido (1 ml) em células MDCK-SIAT1 semeadas num frasco T25 48h antes da inoculação. Para a inoculação, foi removido o meio de crescimento às células que foram lavadas duas vezes com 5 ml de meio suplementado a 37°C e adicionado o 1 ml de inóculo. Após um período de 30 minutos de adsorção do vírus às células à temperatura ambiente, foram adicionados 6 ml de meio de infecção e as células inoculadas foram deixadas a 35°C até à completa destruição da camada celular. Após a confirmação de crescimento viral através da técnica de hemaglutinação, o volume viral obtido foi inoculado da mesma maneira, mas desta vez em 4 frascos T75, utilizando 10 ml de meio suplementado nas lavagens, 1,75 ml de inóculo viral e 15 ml de meio de infecção. No final, após confirmação do crescimento viral, foi feita uma *pool* com os sobrenadantes dos 4 frascos T75 que foi centrifugada a 1200 rpm durante 15 minutos para remover os detritos celulares e o sobrenadante foi distribuído em alíquotas de 500 µl que se conservou a -80°C. Este procedimento foi efectuado em separado para cada um dos stocks virais.



**Figura 13** – Representação esquemática das várias passagens no isolamento do stock viral, desde o produto biológico do biobanco até às aliquotas finas do stock viral constituído

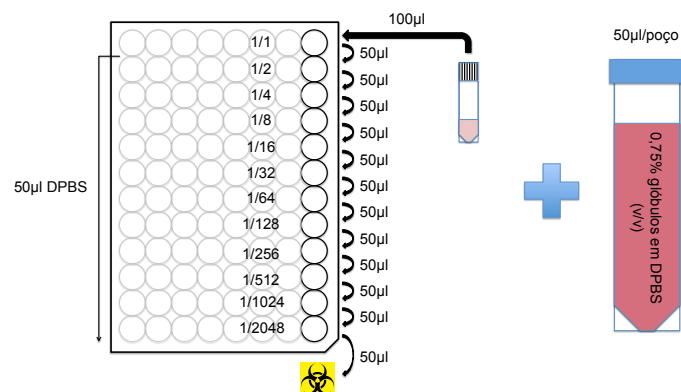
#### 4.3.2.1 Reacção de hemaglutinação

A ausência de efeito citopático característico na infecção das células com o vírus influenza faz com que seja necessário um método que confirme que a destruição celular observada por microscopia se deve à multiplicação do vírus inoculado e não a outro factor que possa destruir as células. O método utilizado neste trabalho para confirmar o isolamento dos vírus influenza foi a reacção de hemaglutinação.

Na reacção de hemaglutinação recorre-se à capacidade das hemaglutininas dos vírus influenza se ligarem aos glóbulos vermelhos formando, na presença de vírus, uma rede que vai impedir que os glóbulos sedimentem. Esta técnica permite não só verificar a ausência/presença de partículas virais como também titular as suspensões virais e expressar o título em unidades hemaglutinantes.

Numa placa de 96 poços, de fundo em U, são adicionados 50 µl de DPBS a todos os poços excepto aos da primeira coluna. Ao poço da primeira coluna são adicionados 100 µl da suspensão viral a testar/titular e destes são pipetados 50 µl para o poço da segunda coluna, homogeneiza-se a solução pipetando e descartando a solução com a pipeta 2-3 vezes, originando uma diluição 1:2 no poço da segunda coluna. Repete-se este procedimento até à última coluna, fazendo diluições sucessivas de 1:2, descartando 50 µl do volume do poço da última coluna (Figura 14). Por fim, adiciona-se 50 µl de uma solução 0,75% (v/v) de glóbulos de cobaio/humano<sup>2</sup> a todos os poços e deixa-se a incubar durante 45 minutos a 4°C (de modo a inibir a actividade da neuraminidase que tem a capacidade de clivar as ligações da hemaglutinina aos glóbulos vermelhos, podendo resultar em falsos negativos).

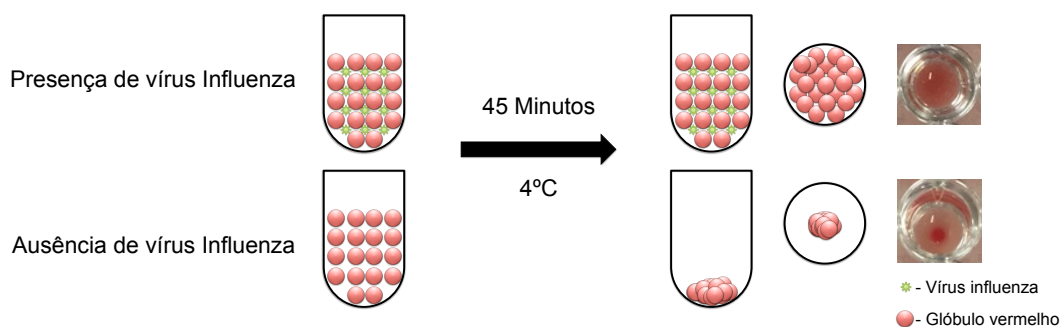
<sup>2</sup> A solução 0,75% de glóbulos de cobaio/humanos é obtida adicionando 5 ml de sangue total (de cobaio - Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa, Portugal; ou humano - INSA, Lisboa, Portugal) a 10 ml de DPBS, esta solução é centrifugada a 1200 rpm durante 10 minutos. Descarta-se o sobrenadante e o *buffy coat* (camada de glóbulos brancos e plaquetas presente acima do concentrado eritrocitário). Lava-se o concentrado eritrocitário 2 vezes ressuspensando o pellet em DPBS até perfazer os 15 ml e centrifuga-se a 1200 rpm durante 10 minutos. Por fim faz-se uma solução 0,75% (v/v) a partir do concentrado eritrocitário obtido em DPBS (p.e. 750 µl de concentrado eritrocitário em 100 ml de DPBS).



**Figura 14** – Representação esquemática da preparação e diluição das amostras na reacção de hemaglutinação.

Os resultados são interpretados observando a presença/ausência de aglutinação, ou seja a ausência/presença de deposição dos glóbulos vermelhos no fundo do poço da placa (Figura 15). O título hemaglutinante é dado pelo inverso do valor da diluição mais alta em que não ocorreu depósito de glóbulos.

Neste trabalho apenas se utilizou esta técnica como um método confirmatório do sucesso dos isolamentos virais. A titulação resultante da aplicação desta técnica reflecte a capacidade hemaglutinante de uma *pool* viral, que varia entre estirpes/subtipos/tipos de vírus influenza, não sendo possível a sua utilização para estabelecer a concentração de vírus a utilizar nos trabalhos subsequentes. Assim, é necessária uma titulação dos stocks virais que reflecta de um modo quantitativo a constituição viral das *pools* de stocks. A titulação dos stocks é descrita no ponto 4.4.



**Figura 15** – Representação esquemática do princípio da reacção de hemaglutinação com um exemplo fotográfico de uma suspensão com vírus influenza e de uma suspensão sem vírus influenza

### 4.3.3 Sequenciação dos stocks virais

Devido à falta de *proofreading* da polimerase viral foi necessário verificar a sequência de todo o genoma dos stocks virais de modo a verificar se não foram induzidas mutações durante o processo de isolamento. O conhecimento do genoma dos stocks virais é, igualmente, importante na construção da biblioteca de genes de cada stock viral pois, é necessário confirmar se o gene clonado tem a mesma sequência nucleotídica que o gene do stock viral. A sequência do stock viral A/Portugal/82/2009 foi obtida como descrito anteriormente (ponto 3.4), para a sequenciação do genoma completo do stock viral B/Lisboa/08/2006 foi necessário implementar/aferir um protocolo de sequenciação para os vírus do tipo B.

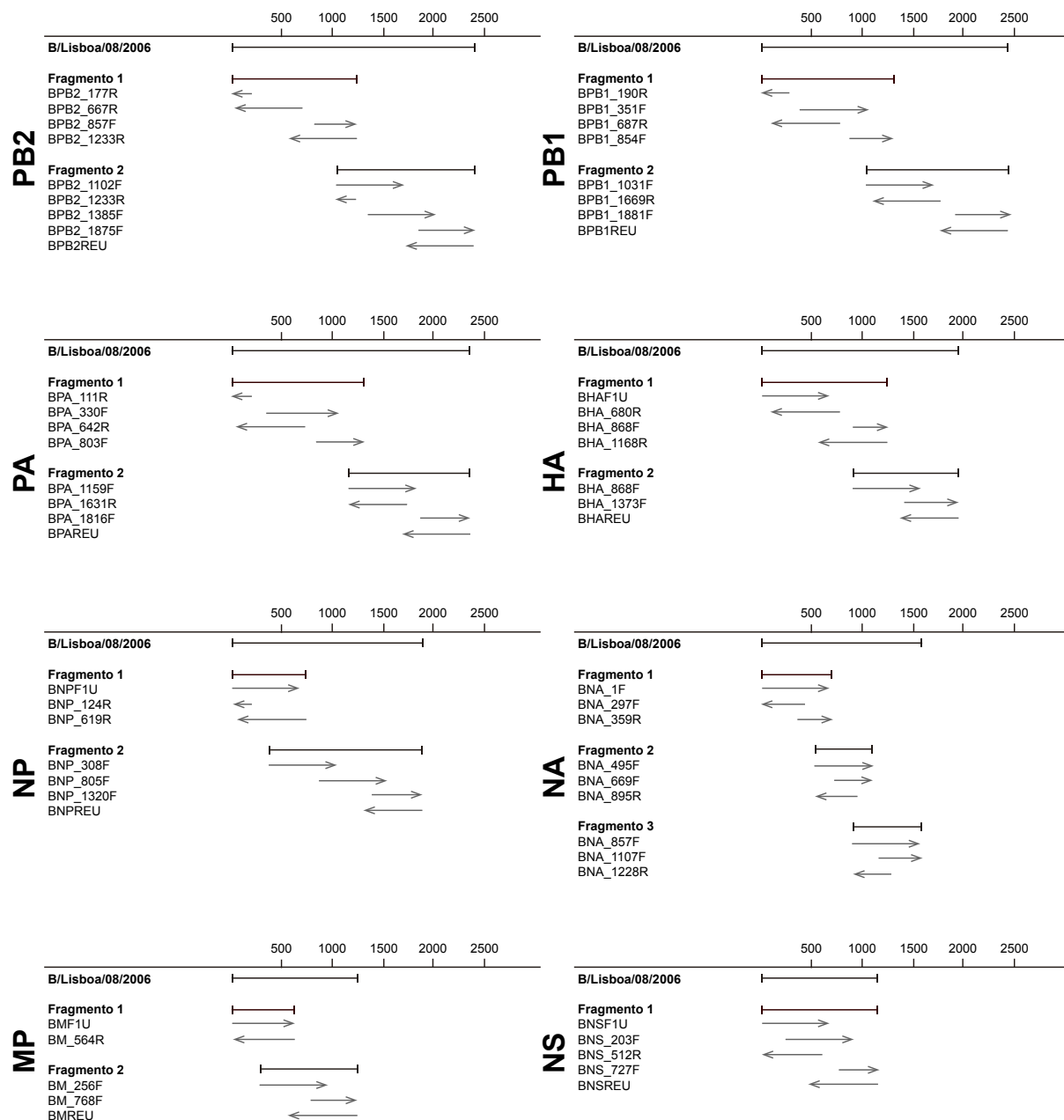
#### 4.3.3.1 Sequenciação do genoma do stock viral do tipo B

A sequenciação do vírus influenza do tipo B foi efectuada utilizando *primers* de um protocolo de sequenciação do genoma completo dos vírus influenza sazonais cedido pela Doutora Mónica Galiano do *Public Health England* (PHE), Londres, Reino Unido. Os *primers* descritos neste protocolo abrangem todo o genoma dos vírus influenza, com bastantes sobreposições, e foram desenhados e adaptados, pelo Doutor Rod Daniels (National Institute for Medical Research, Mill Hill, Londres, Reino Unido), dos descritos inicialmente por Hoffmann *et al.*, 2002 [119].

Para a sequenciação do genoma do stock viral do tipo B foram apenas utilizados os *primers* necessários para se conseguir uma boa amplificação do gene e a sua sequenciação. A representação esquemática da estratégia adaptada e dos *primers* utilizados, na sequenciação do stock viral do tipo B, encontram-se resumidos na Figura 16 e na Tabela VIII, respectivamente.

As metodologias utilizadas para a obtenção das sequências (extracção de RNA, reacção de RT-PCR, reacção de sequenciação cíclica e análise de sequencias) foram as descritas anteriormente no ponto 3.2.2 e 3.2.3 com as condições resumidas na Tabela IX.





**Figura 16** – Representação esquemática da estratégia de sequenciação utilizada na sequenciação do controlo de vírus influenza do tipo B. Adaptada do protocolo cedido pelo PHE.

**Tabela VIII** - Lista de primers utilizados na sequenciação do genoma de vírus influenza do tipo B. Adaptada do protocolo cedido pelo PHE.

Gene	Fragmento	Primer Forward (3' - 5')	Primer Reverse (3' - 5')
PB2	1	<b>BPB2F1U</b> - TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCGGAGCGTTTCAAGATG BPB2_857F - CATTGGAGCTAGCTGTAGAAATTG	<b>BPB2_1233R</b> - CCTAGTGTCTTGAGAAAATACCAT BPB2_177R - ATGTCACCCCTTGGTYARAGC BPB2_667R - CTCAGCTGATGTTGCTCCTG BPB2_1233R - CCTAGTGTCTTGAGAAAATACCAT
	2	<b>BPB2_1102F</b> - ATACAGAAATTGGAATATGGCA BPB2_1102F - ATACAGAAATTGGAATATGGCA BPB2_1385F - ATCACCACAAAGCAAGTGARC BPB2_1875F - TTGCCCTTTTGTCTCACC	<b>BPB2REU</b> - ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAAACACGAGCATTTTTCAC BPB2REU - ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAAACACGAGCATTTTTCAC
PB1	1	<b>BPB1F1U</b> - TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCGGAGCCTTTAAGATG BPB1_351F - TGGAGGCACTAATGGTCACA BPB1_854F - GAAGGCCAACTGTCAAAYGC	<b>BPB1_1255R</b> - CATATTAACATTCCTCATCAT BPB1_190R - CCATTTGTTGGATCTACCATT BPB1_687R - TAGTTTGCCCTTTTCAGCRT
	2	<b>BPB1_1031F</b> - ACCAGAGACAGCCCAATTTGGTT BPB1_1031F - ACCAGAGACAGCCCAATTTGGTT BPB1_1881F - GGCGATTACTTCAACCTCAA	<b>BPB1REU</b> - ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAAACACGAGCCTTTTTCAC BPB1_1669R - CTCCTCTGTGGCATTTGTAG
PA	1	<b>BPAF1U</b> - TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCGGTGCGTTTGATTG BPA_330F - CCAAAGTATCTGGCTGATTG BPA_803F - AAGACCAATAGGCCTCACA	<b>BPA_1392R</b> - GTGTGRAAAAGYACATACTTCATCAT BPA_111R - CAAACCTCTAGATGGACGACAGA BPA_642R - GGAGAAACCGCTGGAAACAG
	2	<b>BPA_1159F</b> - GGATTAACATACCAGAAAATAATGAA BPA_1159F - GGATTAACATACCAGAAAATAATGAA BPA_1816F - TGACCAAAGCTTTTCAAGG	<b>BPAREU</b> - ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAAACACGTGCATTTTTRAT BPA_1631R - TTTTCCCTCCCACTCACAAA BPAREU - ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAAACACGTGCATTTTTRAT
HA	1	<b>BHAF1U</b> - TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCAGAGCATTTTCTAATATC BHAF1U - TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCAGAGCATTTTCTAATATC BHA_868F - GTTGCCCTCAAAGGTGTGGT	<b>BHA_1168R</b> - ACTGCTACTCCATGTGCYC BHA_680R - CTCATTTRGCAGATGAGGTGAA BHA_1168R - ACTGCTACTCCATGTGCYC
	2	<b>BHA_868F</b> - GTTGCCCTCAAAGGTGTGGT BHA_868F - GTTGCCCTCAAAGGTGTGGT BHA_1373F - GCTGACACWATAAGCTCRCAA	<b>BHAREU</b> - ATATCGTCTCGTATTAGTAGTAACAAGAGCATTTTCAAT BHAREU - ATATCGTCTCGTATTAGTAGTAACAAGAGCATTTTCAAT
NP	1	<b>BNPF1U</b> - TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCASAGCATTTTCTYGTG BNPF1U - TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCASAGCATTTTCTYGTG	<b>BNP_619R</b> - GCCTTTGATCTTTGGAACACAG BNP_124R - GGTTMCGGGTTCGTTTGTG BNP_619R - GCCTTTGATCTTTGGAACACAG
	2	<b>BNP_308F</b> - GGACTCAACGATGACATGGA BNP_308F - GGACTCAACGATGACATGGA BNP_805F - GGCAGACAGAGGGCTATTGA BNP_1320F - TGATGTCCATCAAGCTCCAG	<b>BNPREU</b> - ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAAACAACAGCATTTTTCAC BNPREU - ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAAACAACAGCATTTTTCAC
NA	1	<b>BNA_1F</b> - CCAAAATGAACAATGCTACC BNA_1F - CCAAAATGAACAATGCTACC	<b>BNA_653R</b> - TATGTGTGAGTRATGCTTCTCCA BNA_359R - CTTATTATCAAGGGAGCTGAGTTT BNA_653R - TATGTGTGAGTRATGCTTCTCCA
	2	<b>BNA_495F</b> - RGGCAAAATMCCAACAGTAG BNA_495F - RGGCAAAATMCCAACAGTAG	<b>BNA_1039R</b> - TGTGCCATTAGATTCRCAAG BNA_1039R - TGTGCCATTAGATTCRCAAG
MP	1	<b>BNA_857F</b> - CYAGCAATAAAACCATAGAAATGTG BNA_857F - CYAGCAATAAAACCATAGAAATGTG BNA_1107F - CTCTCGAACRATGTCTAAACAYAA	<b>BNA_1463R</b> - TCAACAAAATAGGAACAAAG
	2	<b>BMPF1U</b> - TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCASGCACTTTCTTAARATG BMPF1U - TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCASGCACTTTCTTAARATG	<b>BMP_564R</b> - TCCTTTTCCCATTCCATTCA BMP_564R - TCCTTTTCCCATTCCATTCA
NS	1	<b>BMP_256F</b> - CACAGAGCCCCTATCAGGAA BMP_256F - CACAGAGCCCCTATCAGGAA BMP_768F - TGCTCGAACCATTTCAGATTG	<b>BMPREU</b> - ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAAACAACGCACTTTTCCAG BMPREU - ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAAACAACGCACTTTTCCAG
	1	<b>BNSF1U</b> - TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCAGAGSATTGTTAGTC BNSF1U - TATTCGTCTCAGGGAGCAGAAGCAGAGSATTGTTAGTC BNS_203F - TCACAACAAAAGTGAGCCTGA BNS_727F - CCATCGGATCCTCAACTCAC	<b>BNSREU</b> - ATATCGTCTCGTATTAGTAGTAACAAGAGGATTTTATT BNS_512R - CGTATATCCCTTTTATTGTCAAACG BNSREU - ATATCGTCTCGTATTAGTAGTAACAAGAGGATTTTATT

Os primers utilizados para a amplificação dos fragmentos estão representados a **negrito**, os restantes primers foram utilizados em cada fragmento na reacção de sequenciação cíclica. Bases nucleotídicas: **A** – Adenina, **C** – Citosina, **T** – Timina, **G** – Guanina. Bases nucleotídicas degeneradas: **R** – A/G, **Y** – C/T, **S** – G/C, **W** – A/T, **M** – A/C.

**Tabela IX** – Condições da reacção de RT-PCR e de sequenciação cíclica utilizadas no protocolo de sequenciação do genoma completo do controlo de vírus influenza do tipo B. Adaptado do protocolo cedido pelo PHE.

Mistura de reacção			Condições de incubação	
Reagente	Volume (µl)		Fase	Seq. Cíclica
	RT-PCR	Seq. Cíclica		
Mastermix	7,5	0,5	Transcrição reversa	-
Primer Forward <sup>1</sup>	1,5	1	Desnaturação inicial	4 m a 96°C
Primer Reverse <sup>1</sup>	1,5	1	Reacção da Polimerase em cadeia	30 ciclos
Água	2,5	8	Desnaturação	10 s a 96°C
RNA/DNA	2	0,5	Hibridação	5 s a 50°C
AMV	0,3		Extensão	4 m a 60°C
			Extensão final	8 m a 60°C

1 – volumes para uma concentração de primers a 10 µM e 3,2 µM para a reacção de RT-PCR e de sequenciação cíclica, respectivamente.

#### 4.4 Titulação dos stocks virais

Para ser possível a comparação do efeito de duas estirpes virais em vários estudos, é necessário quantificar a carga viral/dose infecciosa de cada stock viral. Esta quantificação permite igualar, entre as estirpes virais em estudo, a concentração do inóculo viral inicial a usar em todos os estudos posteriores. Nomeadamente, os estudos de análise da cinética da morte celular, apoptose, das vias de apoptose e das vias celulares implicadas na infecção pelo vírus influenza.

Esta titulação dos stocks virais poderá ser determinada, entre outros métodos, através do cálculo das Unidades Formadoras de Placas (PFU – do inglês *plaque form unit*) ou através do cálculo da dose infecciosa necessária para destruir 50% das células em cultura celular (TCID<sub>50</sub> – do inglês *tissue culture infectious dose 50*). Qualquer uma destas metodologias, necessitou de ser implementada.

##### 4.4.1 Titulação das unidades formadoras de placas (PFU)

A titulação pelo método do cálculo das PFU, parte do princípio que cada partícula viral viável tem a capacidade de formar uma *placa* quando se usa um meio de infecção viscoso/sólido (zona limitada de células destruídas, através do efeito citopático provocado pela replicação viral, daqui para a frente referida no texto como *placa* (itálico), de modo a não confundir com as placas de Petri/6 poços utilizadas para a cultura celular) [120, 121].

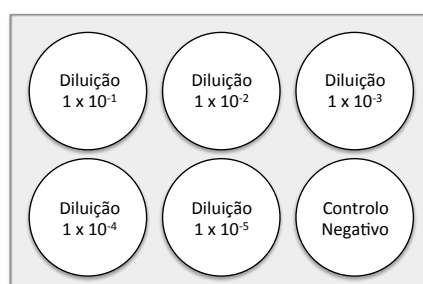
Para que tal seja possível, placas de 6 poços são inoculadas com diluições seriadas do vírus a titular e, através do poço da diluição em que é possível contar o número de *placas* formadas é calculado o título do vírus em pfu/ml.

Para a implementação desta metodologia foram tidas em conta duas abordagens, a abordagem descrita por Cooper *et al.*, 1961 [120] e a abordagem descrita por Matrosovich *et al.*, 2006 [121]. Resumidamente, estas duas abordagens diferem apenas na constituição do meio de infecção após a inoculação viral. Na abordagem clássica é utilizado um meio de infecção com agar que torna o meio de infecção sólido tornando mais complexo o processo de fixação celular e remoção do agar. Na abordagem de Matrosovich *et al.*, 2006 [121] é utilizado um meio viscoso conferido pela adição de uma celulose microcristalina Avicel™ RC/CL (FMC Biopolymer, Bruxelas, Bélgica), que permite uma fácil remoção, por sucção, e posterior fixação das células [121]. Em ambas as abordagens a titulação terá sempre que ser executada em duplicado.

Na implementação da titulação do cálculo das PFU, optou-se, inicialmente, pela abordagem descrita por Matrosovich *et al.*, 2006 [121], por se tratar de uma abordagem adaptada às células MDCK e MDCK-SIAT1, utilizadas neste estudo, e por referir que cria *placas* maiores, o que torna mais fácil a detecção e contagem das mesmas [121].

#### 4.4.1.1 Cálculo de PFU segundo a abordagem descrita por Matrosovich *et al.*, 2006 [121]

Nesta abordagem foram utilizadas células MDCK-SIAT1 semeadas a uma densidade de  $3-4 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em placas de 6 poços colocadas a 37°C em ambiente de atmosfera húmida com 5% CO<sub>2</sub>, de modo a apresentarem uma confluência total após 48h. Confirmada a confluência total da monocamada celular, procedeu-se à preparação de diluições sucessivas ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) do vírus stock a titular, em meio suplementado (diluição  $10^{-1}$  - 900 µl de meio suplementado + 100 µl de vírus stock; diluição  $10^{-2}$ - $10^{-5}$  - 900 µl de meio suplementado + 100 µl da diluição anterior) com o cuidado de homogeneizar cada diluição num vortex antes da preparação da diluição seguinte. Após a preparação das diluições, as placas de 6 poços com as células em monocamada foram retiradas da estufa de CO<sub>2</sub>, removido todo o meio de crescimento e lavadas com 1 ml de meio suplementado previamente aquecido a 37°C (este passo permite a remoção do FBS que inibe o crescimento do vírus influenza em cultura celular). Após a lavagem, a cada poço da placa foram adicionados 300 µl da respectiva diluição e 300 µl de meio suplementado ao poço controlo, conforme esquema da Figura 17.



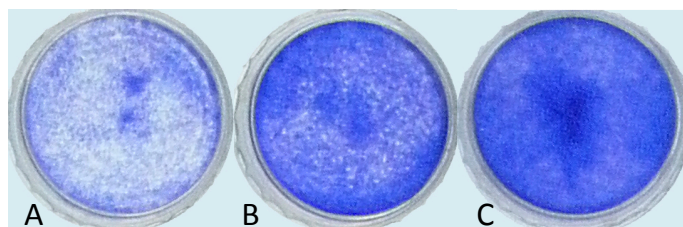
**Figura 17** – Representação esquemática da distribuição das diluições sucessivas virais a serem tituladas numa placa de 6 poços para o cálculo das PFUs.

Para a adsorção dos vírus, as placas foram mantidas à temperatura ambiente durante 1 h, com ligeira agitação manual de 10 em 10 minutos para homogeneizar o inóculo por toda a superfície celular. Após a adsorção, foi removido o inóculo de cada poço e adicionados 3 ml de uma solução de

1:1 de meio de infecção com 5 µg/µl em vez dos 3 µg/µl de tripsina-TPCK (Tabela VI) e de 2,4% de Avicel™ (reagente previamente preparado em água e autoclavado). As placas de 6 poços foram mantidas em atmosfera húmida numa estufa com 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 dias, tempo necessário para a formação de *placas*.

Para a detecção de *placas* foi utilizado, em alternativa ao proposto por Matrosovich *et al.*, 2006 [121], uma solução de cristal de violeta que cora todas as células e deixa as *placas* sem coloração permitindo a sua visualização e contagem. Assim, ao final dos 3 dias de incubação, as placas de 6 poços foram ligeiramente agitadas para reduzir a viscosidade do sobrenadante, que foi removido por sucção. As células foram fixas com uma solução de 4% de paraformaldeído (Merck, Darmstadt, Alemanha) em DMEM durante 30 minutos a 4°C, lavadas três vezes com 1 ml de DPBS e coradas com 600 µl de uma solução de 1% de cristal de violeta (Merck) preparado com uma solução de 20% metanol (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany), durante 15 minutos à temperatura ambiente após os quais é removida a solução de cristal violeta e as placas lavadas com água até remover todo o excesso da solução de cristal de violeta.

A aplicação desta abordagem não foi bem sucedida. Em nenhuma das tentativas/condições testadas foram observadas *placas*, tendo-se observado destruição total da monocamada nas diluições mais altas e destruição parcial, não isolada, da monocamada nas diluições intermédias (Figura 18). Indicando-nos que o meio utilizado não apresenta viscosidade suficiente para restringir a replicação viral a um ponto isolado da monocamada, levando a uma propagação da progénie viral, por correntes de convecção, à restante monocamada celular. Com estes resultados, esta abordagem foi abandonada e passou-se a testar a abordagem descrita por Cooper *et al.*, 1961 [120] de acordo com uma metodologia gentilmente cedida pelo PHE e que não se encontra publicada.

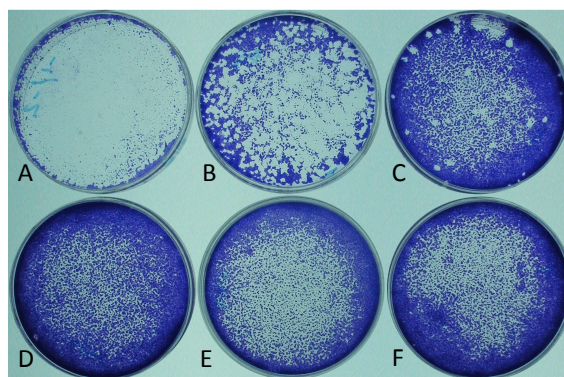


**Figura 18** – Fotografia de placas com a aplicação da metodologia proposta por Matrosovich *et al.*, 2006 [121] com destruição quase total da monocamada celular no primeiro poço, correspondente à diluição  $1 \times 10^{-1}$  (A); uma ligeira destruição da monocamada celular, sem formação de placas, na diluição  $1 \times 10^{-2}$  (B) e o controlo negativo (C).

#### 4.4.1.2 Cálculo de PFU segundo a abordagem descrita por Cooper *et al.*, 1961 [120]

Na abordagem descrita por Cooper *et al.*, 1961 [120], (protocolo referência V-5388/03-09 do PHE para os vírus influenza), a metodologia inicial é igual à descrita anteriormente no que se refere à preparação da monocamada celular nas placas de 6 poços, à preparação das diluições sucessivas e à inoculação e adsorção do vírus a titular. A diferença reside no processo de preparação e constituição do meio de infecção. Durante a hora de incubação das placas com o inóculo, foram preparados 10 ml (por placa de 6 poços) de meio personalizado (DMEM/F12 - 2x, Glutamax<sup>TM</sup>, 40mM de HEPES – Gibco, Life Technologies<sup>TM</sup>) suplementado com PSN 2x, fungizona 2x e colocado a 37°C. Aliquotas de 10 ml de agarose *Immunodiffusion Grade* a 2% (previamente preparadas e autoclavadas; MP Biomedicals, Solon, Ohio, EUA) foram colocadas em banho de água a 100°C até atingirem o estado líquido altura em que foram transferidas para um banho de água a 45°C para descer a temperatura da agarose. Após o período de adsorção, o inóculo foi removido das placas de 6 poços, foram adicionados 5 µg/ml de tripsina-TPCK à alíquota de meio suplementado e esta mistura foi adicionada à alíquota de 10 ml de agarose. Após homogeneização, foram adicionados 3 ml da mistura final a cada poço da placa. A placa foi deixada à temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir o arrefecimento e polimerização do meio. As placas de titulação dos vírus do tipo A foram incubadas durante 3 dias em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C e os vírus do tipo B a 33°C. Após os 3 dias de incubação, para a fixação foram adicionados 2 ml de uma solução de 5% de glutaraldeído (Merck) durante 2h, para permitir a penetração do fixador através do meio polimerizado, foi removido o excesso de glutaraldeído e o meio polimerizado foi removido em água corrente. O processo de coloração utilizado foi o descrito anteriormente (coloração com cristal de violeta). Em cada diluição com *placas* visíveis e individualizadas (Figura 19) foi contabilizado o número de placas e calculado o título viral em pfu/ml.

A aplicação desta metodologia permitiu a titulação dos vírus influenza do tipo A, no entanto, nos vírus influenza do tipo B não foi possível observar *placas*, embora se tenha testado, sem sucesso, várias alterações ao protocolo.



**Figura 19** – Exemplo de um poço com placas visíveis e individualizadas, utilizando a abordagem de descrita por Cooper *et al.* adaptada pelo PHE, que permitiu o cálculo das pfus. **A - E** – diluição viral  $1 \times 10^{-1}$  à diluição  $1 \times 10^{-5}$ , **F** – Controlo Negativo.

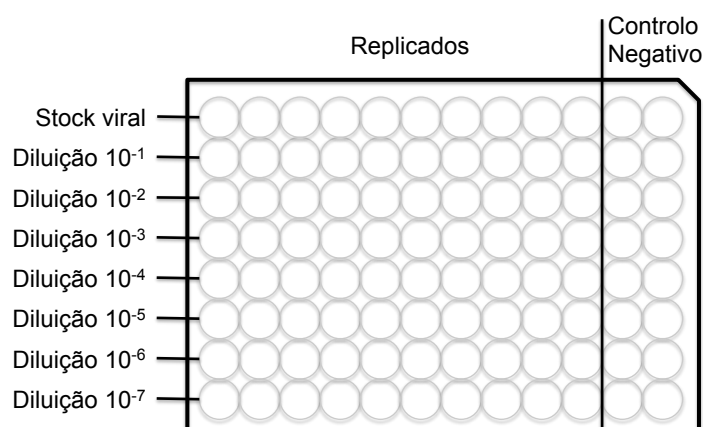
#### 4.4.2 Titulação da dose infecciosa em cultura celular (TCID<sub>50</sub>)

Na falta de um método de titulação por *placas* que permitisse a titulação dos vírus influenza do tipo A e dos vírus influenza do tipo B, foi necessário recorrer a outro método para o cálculo da concentração viral optou-se pelo método do cálculo da dose infecciosa necessária para destruir 50% das células em cultura celular (TCID<sub>50</sub> – do inglês *Tissue Culture Infectious Dose 50*). Este método permite calcular a concentração viral/dose infecciosa necessária para produzir 50% de destruição numa cultura celular inoculada, e é expresso em TCID<sub>50</sub>/ml.

Existem diversos metodos para calcular o TCID<sub>50</sub> porém neste trabalho, o TCID<sub>50</sub> foi calculado segundo o método Reed e Muench [122].

Neste método foram utilizadas células MDCK-SIAT1 semeadas a uma concentração de  $3-4 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> em placas de 96 poços colocadas a 37°C em ambiente de atmosfera húmida com 5% CO<sub>2</sub>, de modo a apresentarem uma confluência total após 48h. Confirmada a confluência total da monocamada celular, após as 48h, procedeu-se à preparação de diluições sucessivas ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ) em meio suplementado do vírus a titular, com o cuidado de homogeneizar cada diluição, num vórtex, antes da preparação da diluição seguinte. Após a preparação das diluições, as células em monocamada nas placas de 96 poços foram retiradas da estufa de CO<sub>2</sub>, removido todo o meio de crescimento e lavadas com 100 µl de meio suplementado previamente aquecido a 37°C. Após a lavagem, à primeira linha da placa foram adicionados 25 µl do vírus a titular (excepto nos últimos dois poços), e às restantes linhas foram adicionados 25 µl da respectiva diluição (10 replicados por

diluição), tendo sido adicionados 25 µl de meio suplementado aos poços controlo (últimos dois poços de cada linha da placa de 96), conforme esquema da Figura 20.



**Figura 20** – Representação esquemática da distribuição das diluições virais, controlo negativo e respectivos replicados ao longo da placa de 96 poços na titulação por TCID<sub>50</sub>

As placas foram deixadas à temperatura ambiente durante 30 minutos para a adsorção do vírus e, após este periodo, foram adicionados 175 µl de meio de infecção a cada poço e a placa, de 96 poços, foi deixada a incubar durante 72h a 37°C numa estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. No final das 72h, para verificar se os poços foram destruídos pelo vírus em titulação, a leitura dos poços positivos/negativos foi feita recorrendo à reacção de hemaglutinação. Resumidamente, 50 µl do sobrenadante de cada poço foram transferidos para o poço correspondente da placa de hemaglutinação (placa de 96 poços de fundo em U) e, posteriormente, adicionados 50 µl de 0,75% concentrado eritrocitário a cada poço. A placa foi mantida a 4°C durante 45 minutos e os resultados, poço positivo/negativo, foram lidos e registados consoante a presença/ausência de aglutinação.

No cálculo do TCID<sub>50</sub> pelo método de *Reed and Muench*, começa-se por calcular as frequências cumulativas dos poços positivos da diluição mais elevada para a diluição mais baixa (da diluição 10<sup>-7</sup> até à diluição 10<sup>0</sup>) e a dos poços negativos da diluição mais baixa para a diluição mais elevada (da diluição 10<sup>0</sup> até à diluição 10<sup>-7</sup>). Para cada diluição calcula-se a razão e percentagem de destruição celular acumulada.

A diluição que induz 50% de destruição da cultura celular inoculada é determinada pela diluição com a percentagem de destruição celular acumulada superior a 50% (X) e pela distância proporcional (DP) entre esta e a diluição mais baixa seguinte (Y) que é calculada através da fórmula DP =



$\frac{\% X - 50\%}{\% X - \% Y}$ , ou seja, temos 1 TCID<sub>50</sub> na diluição X – DP, ou seja em 10<sup>X - DP</sup> ml. Por fim, calcula-se a quantidade de TCID<sub>50</sub>/ml nos 25 µl de inóculo e por fim no stock viral.

Exemplo:

**Tabela X** – Exemplo dos valores obtidos e respectivo cálculo do TCID<sub>50</sub> para uma das estirpes utilizadas na implementação desta metodologia

diluição	Positivos	Negativos	Valores acumulados				
			Positivos	Negativos	total	razão	razão (%)
10 <sup>0</sup>	10	0	38	0	38	1,00	100
10 <sup>-1</sup>	10	0	28	0	28	1,00	100
10 <sup>-2</sup>	10	0	18	0	18	1,00	100
10 <sup>-3</sup>	4	6	8	6	14	0,57	57
10 <sup>-4</sup>	2	8	4	14	18	0,22	22
10 <sup>-5</sup>	1	9	2	23	25	0,08	8
10 <sup>-6</sup>	1	9	1	32	33	0,03	3
10 <sup>-7</sup>	0	10	0	42	42	0	0

Neste exemplo, a diluição que induz 50% de destruição da cultura celular inoculada encontra-se entre a diluição 10<sup>-3</sup> (Y) e a diluição 10<sup>-4</sup> (X). A distância proporcional, neste caso será DP = (57-50) / (57-22) = 0,2. Assim, a diluição que induz 50% de destruição da cultura celular inoculada é de -3 – 0,2 = -3,2.

Ou seja, 10<sup>-3,2</sup> = 6,244 x 10<sup>-4</sup> ml de vírus titulado vão induzir 50% de destruição da cultura celular inoculada e os 25 µl inoculados apresentam uma dose infecciosa de 1 / 6,244 x 10<sup>-4</sup> = 1,6 x 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>, resultando num título final de 1,6 x 10<sup>3</sup> / 0,025 = 6,41 x 10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/ml

A implementação desta metodologia foi bem sucedida na titulação de todas as estirpes virais testadas, incluindo as estirpes do tipo B.

Na Tabela XI encontram-se resumidos os resultados obtidos na titulação das estirpes A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006.

**Tabela XI** – Titulação dos stocks virais com as duas metodologias testadas

Estirpe	(sub)Tipo	Título	
		PFU (PFU/ml)	TCID <sub>50</sub> (TCID <sub>50</sub> /ml)
A/Portugal/82/2009	A(H1N1)pdm09	8,33 x 10 <sup>3</sup>	1,59 x 10 <sup>2</sup>
B/Lisboa/08/2006	B	-	1,25 x 10 <sup>2</sup>

Através dos títulos TCID<sub>50</sub> obtidos determinou-se que para todos os ensaios seria utilizado uma dose infecciosa de 0,01 MOI (do inglês *Multiplicity of Infection*), ou seja 0,01 TCID<sub>50</sub>/célula.

#### **4.5 Construção da biblioteca de genes**

A metodologia utilizada para a construção da biblioteca de genes foi implementada com base num protocolo inicialmente cedido pelo Doutor Ruben O. Donis, *Influenza Division, Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*, Atlanta, EUA. O plasmídeo bidireccional de expressão utilizado *pCIPolISapIT* (ANEXO C) foi igualmente cedido pelo Doutor Ruben O. Donis.

A implementação desta metodologia funcionou para os genes M e NS da estirpe A/Portugal/82/2009 e da estirpe B/Lisboa/08/2006 e para o gene da proteína GFP(*Green Fluorescence Protein*, utilizada na aferição das condições de transfecção das células MDCK-SIAT1). Para os restantes genes foi necessário aferir e implementar um protocolo que possibilitasse amplificar numa única reacção de RT-PCR todo os restantes segmentos genéticos. Na aferição desta amplificação recorreu-se a um oePCR (*overlap extension PCR*) e/ou ao kit comercial *TOPO TA cloning kit*.

##### **4.5.1 Segmentos genéticos M, NS e gene GFP**

Resumidamente, para incorporar um segmento genético do vírus influenza no plasmídeo bidireccional de expressão *pCIPolISapIT* começou-se por amplificar o segmento genético com um par de *primers* desenhados de maneira a conterem na sua extremidade 3' a sequência nucleotídica reconhecida pela enzima de restrição *SapI*, sequência que vai ser introduzida nas extremidades do segmento genético amplificado durante a reacção de RT-PCR. Após a purificação do segmento amplificado, este e o plasmídeo de expressão são digeridos com a enzima de restrição *SapI* seguindo-se uma reacção de ligação que vai incorporar o segmento genético no plasmídeo de expressão. O plasmídeo contendo o segmento é então inserido em células *E. Coli* quimicamente competentes que são colocadas a crescer. As colónias formadas são recolhidas e propagadas. Proceda-se à extracção do DNA plasmídico dos propagados e o mesmo é analisado, através da digestão com a enzima de restrição *XbaI*, para a confirmação da inserção do segmento genético no plasmídeo de expressão. Por fim, os plasmídeos contendo o segmento genético são sequenciados para confirmar se a sequência inserida é igual à do vírus.

#### 4.5.1.1 Amplificação do segmento genético

Para a amplificação dos segmentos genéticos utilizou-se o RNA viral extraído dos stocks virais constituídos anteriormente do vírus influenza do tipo A, A/Portugal/82/2009, e do vírus influenza do tipo B, B/Lisboa/08/2006. A extracção do RNA viral foi efectuada utilizando o kit de extracção de RNA viral QIAmp viral RNA mini kit de acordo com o descrito anteriormente no ponto 3.2.2.

A amplificação dos segmentos genéticos foi efectuada utilizando o kit comercial de RT-PCR *QIAgen OneStep RT-PCR* (QIAgen) e as condições de transcrição reversa, de amplificação e os *primers* utilizados encontram-se resumidos na Tabela XII e na Tabela XIII, respectivamente. A sequência dos *primers* contém na extremidade 5' uma extensão que vai incorporar no segmento amplificado a zona de restrição reconhecida pela enzima *SapI*.

**Tabela XII** – Condições da reacção de RT-PCR utilizadas na amplificação dos segmentos genéticos completos do vírus influenza do tipo A e do tipo B

Mistura de reacção		Condições de Incubação	
Reagente	Volume (µl)	Fase	
Água livre nucleases	30	Transcrição reversa	30 m a 50°C
Primer Forward (10 µM)	1	Desnaturação inicial	15 m a 95°C
Primer Reverse (10 µM)	1	Reacção da Polimerase em cadeia	40 ciclos
Tampão	10	Desnaturação	1 m a 94°C
dNTPs	2	Hibridação	1 m a 55°C
RNA	5	Extensão	2 m a 72°C
Enzimas	1	Extensão final	10 m a 72°C

**Tabela XIII** – Primers utilizados para a amplificação dos segmentos genéticos completos do vírus influenza do tipo A e do tipo B. A sequência dos *primers* para o vírus influenza do tipo A foram cedidas pelo Doutor Ruben O. Donis. A sequência dos *primers* para o vírus influenza do tipo B foram adaptadas do protocolo de sequenciação do vírus influenza do tipo B (ponto 4.3.3.1) de modo a conterem a zona de reconhecimento da enzima de restrição *SapI*.

Gene <sup>1</sup>	Virus influenza do tipo A		Virus influenza do tipo B	
<b>PB2</b> (2,4kb)	PB2uniSapIF	<b>GATCGCTCTTCA</b> GGGAGCRAAAGCAGGTC	BPB2F1U_SAP	<b>GATCGCTCTTCA</b> GGGAGCAGAAGCGGAGCGTTTTCAAGATG
	PB2uniSapIR	<b>ACTGGCTCTTCT</b> ATTAGTAGAAACAAGGTCGTTT	BPB2REU_SAP	<b>ACTGGCTCTTCT</b> ATTAGTAGAAACACGAGCATTITTCAC
<b>PB1</b> (2,4kb)	PB1uniSapIF	<b>GATCGCTCTTCA</b> GGGAGCRAAAGCAGGCA	BPB1F1U_SAP	<b>GATCGCTCTTCA</b> GGGAGCAGAAGCGGAGCGCTTTAAGATG
	PB1uniSapIR	<b>ACTGGCTCTTCT</b> ATTAGTAGAAACAAGGCATT	BPB1REU_SAP	<b>ACTGGCTCTTCT</b> ATTAGTAGAAACACGAGCGCTTTTTC
<b>PA</b> (2,3kb)	PAuniSapIF	<b>GATCGCTCTTCA</b> GGGAGCRAAAGCAGGTAC	BPAF1U_SAP	<b>GATCGCTCTTCA</b> GGGAGCAGAAGCGGTGCGTTTGATTG
	PAuniSapIR	<b>ACTGGCTCTTCT</b> ATTAGTAGAAACAAGGTACTT	BPAREU_SAP	<b>ACTGGCTCTTCT</b> ATTAGTAGAAACACGTGCATTITTRAT
<b>HA</b> (1,8kb)	HAuniSapIF	<b>GATCGCTCTTCA</b> GGGAGCAAAAGCAGGGG	BHAF1U_SAP	<b>GATCGCTCTTCA</b> GGGAGCAGAAGCAGACATTTTCAATATC
	HAuniSapIR	<b>ACTGGCTCTTCT</b> ATTAGTAGAAACAAGGTGTTTT	BHAREU_SAP	<b>ACTGGCTCTTCT</b> ATTAGTAGTAACAAGAGCATTITTTCAAT
<b>NP</b> (1,6/1,9kb)	NPuniSapIF	<b>GATCGCTCTTCA</b> GGGAGCAAAAGCAGGGTA	BNPF1U_SAP	<b>GATCGCTCTTCA</b> GGGAGCAGAAGCASAGCATTITCTYGTG
	NPuniSapIR	<b>ACTGGCTCTTCT</b> ATTAGTAGAAACAAGGTATTTTT	BNPREU_SAP	<b>ACTGGCTCTTCT</b> ATTAGTAGAAACAACGACATTTTTC
<b>NA</b> (1,5kb)	NAuniSapIF	<b>GATCGCTCTTCA</b> GGGAGCAAAAGCAGGAGT	BNAF1U_SAP	<b>GATCGCTCTTCA</b> GGGAGCAGAAGCAGAGCATCTTCTCA
	NAuniSapIR	<b>ACTGGCTCTTCT</b> ATTAGTAGAAACAAGGATTTTT	BNAREU_SAP	<b>ACTGGCTCTTCT</b> ATTAGTAGTAACAAGAGCATTITTTTCA
<b>MP</b> (1,0/1,2kb)	MuniSapIF	<b>GATCGCTCTTCA</b> GGGAGCAAAAGCAGGTAG	BMPF1U_SAP	<b>GATCGCTCTTCA</b> GGGAGCAGAAGCASGCACTTTCTTAARATG
	MuniSapIR	<b>ACTGGCTCTTCT</b> ATTAGTAGAAACAAGGTATTTTT	BNPREU_SAP	<b>ACTGGCTCTTCT</b> ATTAGTAGAAACAACGCACTTTTCCAG
<b>NS</b> (0,9/1,1kb)	NSuniSapIF	<b>GATCGCTCTTCA</b> GGGAGCAAAAGCAGGGTG	BNSF1U_SAP	<b>GATCGCTCTTCA</b> GGGAGCAGAAGCAGAGSATTTGTTAGTC
	NSuniSapIR	<b>ACTGGCTCTTCT</b> ATTAGTAGAAACAAGGTGTTTT	BNSREU_SAP	<b>ACTGGCTCTTCT</b> ATTAGTAGTAACAAGAGGATTTTTATT

**Negrito** – sequência nucleotídica na extremidade 5' que vai incorporar em cada segmento genético de vírus influenza amplificado as zonas de restrição reconhecidas pela enzima *SapI*. **1** – Tamanho aproximado do fragmento amplificado em kilo bases (tipo A/tipo B)

A confirmação da amplificação foi efectuada em gel de agarose 1,5% em TAE (tampão Tris-Acetato-EDTA, Lonza, Verviers, Bélgica) com brometo de etídio (Merck) incorporado e a utilização de um marcador de pesos moleculares *1kb DNA Ladder* (New England Biolabs® Inc, Ipswich, Massachusetts, EUA). O peso molecular previsto para cada segmento genético encontra-se descrito na Tabela XIII.

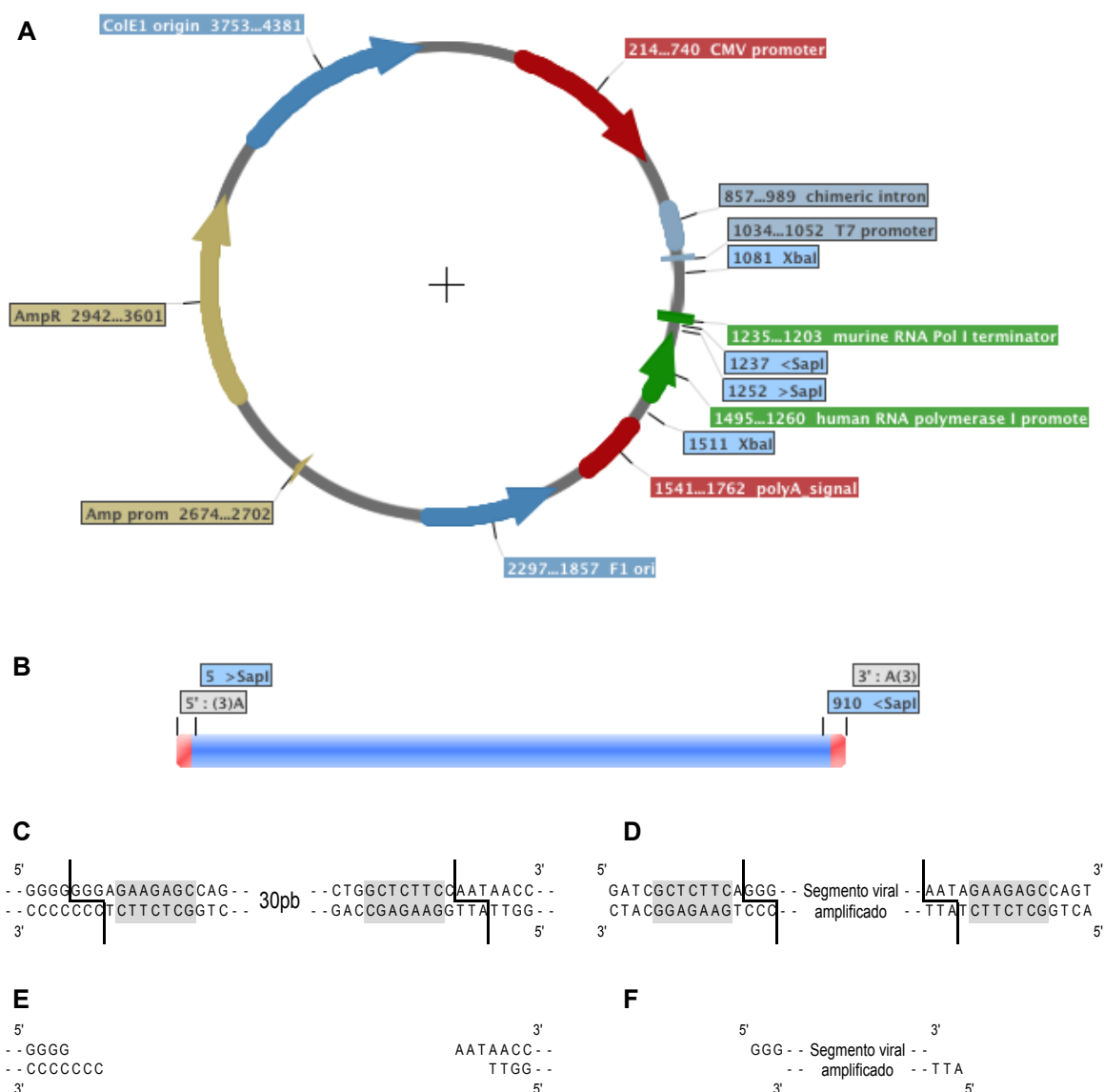
Após a confirmação da amplificação, procedeu-se à purificação do DNA amplificado utilizando os kits *QIAquick PCR purification kit* (QIAGEN) e *QIAquick gel extraction kit* (QIAGEN) na ausência ou presença de bandas inespecíficas, respectivamente.

Na ausência de bandas inespecíficas, todo o volume resultante da reacção de RT-PCR foi purificado utilizando o kit comercial *QIAquick PCR purification kit* de acordo com as instruções do fabricante. Neste procedimento o volume resultante da reacção de RT-PCR é misturado com 5 volumes do tampão PB que vai tornar o pH da solução num pH ideal para ocorrer a captura do DNA amplificado na membrana da coluna de purificação. A coluna de purificação é lavada, com tampão de lavagem, para remover os vestígios de sais que possam ter ficado na membrana e, por fim, o DNA amplificado é recuperado da membrana, utilizando o tampão de eluição.

Na presença de bandas inespecíficas todo o volume resultante da reacção de RT-PCR foi aplicado num gel de agarose 1,5% em TAE com brometo de etídio incorporado. As bandas contendo o DNA amplificado foram excisadas do gel e recuperadas utilizando o kit comercial *QIAquick gel extraction kit* de acordo com as instruções do fabricante. Neste procedimento os fragmentos de gel contendo o DNA amplificado são dissolvidos em 2 volumes do tampão QB a 50°C aos quais se adiciona 1 volume de isopropanol para aumentar a quantidade de DNA recuperado. A coluna de purificação é lavada com tampão, para remover os vestígios de sais e de agarose que possam ter ficado na membrana e, por fim, o DNA amplificado é recuperado da membrana utilizando o tampão de eluição. Após a purificação, o DNA é quantificado por espectrofotometria utilizando um biofotómetro de quantificação de ácido nucleicos. Para tal procedeu-se à diluição de 2 µl de DNA purificado em 58 µl de água livre de nucleases (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) e a quantidade de DNA foi analisada utilizando uma diluição de 2 µl de tampão de eluição em 58 µl de água, como branco para calibrar o biofotómetro.

#### 4.5.1.2 Digestão e ligação do segmento genético ao plasmídeo

Após a amplificação do segmento viral procedeu-se à digestão deste e do plasmídeo *pCIPollSapIT* com a enzima de restrição *SapI* (New England Biolabs® Inc). Esta enzima de restrição reconhece uma sequência de 7 nucleótidos específica e digere o DNA, 1 nucleótido após a zona de reconhecimento, criando uma terminação coesiva que varia consoante a sequência genética. Esta propriedade da enzima de restrição permite a ligação dos segmentos virais amplificados ao plasmídeo na orientação desejada (Figura 21).



**Figura 21** – Representação esquemática da digestão e ligação do segmento amplificado ao plasmídeo bidireccional de expressão *pCIPollSapIT*. Representação da localização das zonas de reconhecimento da enzima de restrição *SapI* no plasmídeo bidireccional de expressão *pCIPollSapIT* (A) e nos segmentos virais amplificados (B); da sequência reconhecida pela enzima de restrição *SapI* no plasmídeo (C) e no segmento viral amplificado (D) sombreada a cinzento, zona de corte – linha contínua; e o plasmídeo (E) e o segmento viral (F) digeridos.

Para a digestão do fragmento viral amplificado, a 2 µg de segmento viral foram adicionados 5 µl de tampão 4, 1 µl de *SapI* (2U) e os 50 µl de volume total da reacção foram feitos com água estéril livre de nucleases. O fragmento foi digerido a 37°C durante 90 minutos. Para a digestão do plasmídeo, a 5 µg de plasmídeo foram adicionados 5 µl de tampão 4, 3 µl de *SapI* (6U) e os 50 µl de volume total da reacção foram feitos com água estéril livre de nucleases. O plasmídeo foi digerido a 37°C durante 180 minutos. A digestão foi confirmada por electroforese em gel de agarose 1,5% em TAE com brometo de etídio incorporado com a utilização de um marcador de pesos moleculares *1kb DNA Ladder*. A digestão confirma-se de acordo com a banda obtida no poço do plasmídeo digerido e é extrapolada para o segmento genético (a digestão completa do plasmídeo apresenta uma banda bem definida no gel de agarose, enquanto que a não digestão ou a digestão incompleta do plasmídeo dá origem a uma banda com a forma de cometa).

Após a confirmação da digestão do plasmídeo e do segmento amplificado digeridos com a enzima de restrição *SapI*, os produtos da digestão foram purificados utilizando o kit comercial *QIAquick PCR purification kit*, de acordo com o descrito no ponto anterior, de maneira a descartar a enzima de restrição *SapI*, o fragmento de 30 pb resultante da digestão do plasmídeo e os terminais do fragmento amplificado digerido. Por fim, é determinada a concentração de DNA de cada produto digerido e purificado (plasmídeo e segmento genético), de acordo com as metodologias de quantificação de DNA descritas no ponto anterior.

Após a digestão do plasmídeo e do segmento viral amplificado, procedeu-se à reacção de ligação do segmento amplificado ao plasmídeo bidireccional de expressão recorrendo à enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs® Inc). Para tal, foram calculadas as quantidades de plasmídeo e de segmento viral necessárias para se proceder à reacção de ligação nas proporções 1:1, 1:3 e 1:5 de quantidades molares de plasmídeo:segmento, mantendo as quantidades totais de DNA inferiores a 200 ng por reacção. Aos volumes calculados de plasmídeo e de segmento viral foram adicionados 2 µl de tampão T4, 1 µl de T4 DNA ligase e os 20 µl de volume total da reacção foram feitos com água estéril livre de nucleases. A mistura de reacção de ligação foi incubada a 16°C durante 1h.

#### 4.5.1.3 Transformação de células quimicamente competentes

Células *E. Coli OneShot TOP10* quimicamente competentes (Invitrogen, Life Technologies) foram transformadas com os produtos de ligação logo após a incubação de 1h a 16°C. Uma alíquota de 50

μl de células *E. Coli OneShot TOP10* quimicamente competentes foi lentamente descongelada, em gelo, e dividida em 3 tubos com 15 μl cada. A um dos tubos foram adicionados 1,5 μl do produto de ligação de razão 1:1, a outro 1,5 μl do produto de ligação de razão 1:3 e ao terceiro tubo 1,5 μl do produto de ligação de razão 1:5. As células foram deixadas em banho de gelo durante 30 minutos em seguida foi efectuado um choque térmico colocando os tubos num banho seco a 42°C, durante 30 segundos, após os quais os tubos foram colocados novamente em banho de gelo por mais 2 minutos. Por fim foram adicionados 250 μl de meio SOC (fornecido com as células quimicamente competentes) ou 250 μl de meio LB<sup>3</sup> (sem ampicilina) a cada tubo e deixados a incubar durante 1h, a 37°C, com agitação de 150-200 rpm.

Cada condição foi plaqueada em duas placas com meio LB sólido com ampicilina<sup>4</sup>, uma placa com o produto da reacção de transformação e a outra com o produto da reacção de transformação concentrado. Ou seja, 25 μl do produto da reacção de transformação foram pipetados para uma placa com meio LB sólido com ampicilina, e este volume foi espalhado por toda a placa com o recurso a um espalhador em L de modo a distribuir o volume de células transformadas pela maior área possível de meio LB. O restante volume do produto da reacção de transformação sofreu, na centrifuga, um pequeno *spin*, foram descartados 200 μl, e o restante volume foi utilizado para ressuspender as células depositadas pela centrifugação no fundo do tubo que foram plaqueadas na segunda placa de meio LB sólido com ampicilina. Este procedimento foi repetido para cada tubo de células transformadas. As placas foram colocadas a incubar durante a noite a 37°C até à formação de colónias.

#### 4.5.1.4 PCR Colony

Das placas deixadas a incubar durante a noite com as células *E. Coli OneShot TOP10* quimicamente competentes transformadas com os plasmídeos, foram seleccionadas as placas de cada condição (1:1, 1:3 e 1:5) que continham as melhores colónias para colheita (colónias maiores e diferenciadas). De cada condição foram colhidas 10-20 colónias. Com uma ponta de micropipeta estéril picou-se uma colónia, esfregou-se a ponta num microtubo de 0,2 ml vazio e conservou-se a ponta dentro de

---

<sup>3</sup> Meio LB líquido: 5 g de triptona (Conda - Pronadisa, Madrid, Espanha), 2,5 g de extracto de levedura (Conda - Pronadisa) e 2,5 g de cloreto de sódio (Duchefa Biochemies, Haarlem, Holanda). Adicionar água bidestilada até perfazer 500 ml, agitar e autoclavar durante 20 minutos a 121°C

<sup>4</sup> Meio LB sólido com ampicilina: 5 g de triptona, 2,5 g de extracto de levedura, 2,5 g de cloreto de sódio e 7,5 g de agar nutritivo (Conda – Pronadisa). Adicionar água bidestilada até perfazer 500 ml, agitar e autoclavar durante 20 minutos a 121°C. Antes de arrefecer totalmente e a uma temperatura suportável ao toque foram adicionados 500 μl de ampicilina a 100 mg/ml. O meio foi homogeneizado e distribuído por placas.

um tubo *falcon* de 15 ml estéril a 4°C até ao resultado do PCR *colony*. A cada tubo de PCR foram adicionados 50 µl de água estéril livre de nucleases e os tubos foram colocados a 99°C durante 5 minutos de modo a libertar todos os ácidos nucleicos para o sobrenadante. Os tubos foram sujeitos a um *spin*, numa centrifuga de bancada, de modo a depositar os restos das células e 2 µl do sobrenadante foram pipetados para novos microtubos de PCR contendo 48 µl da mistura de reacção de PCR (Tabela XIV).

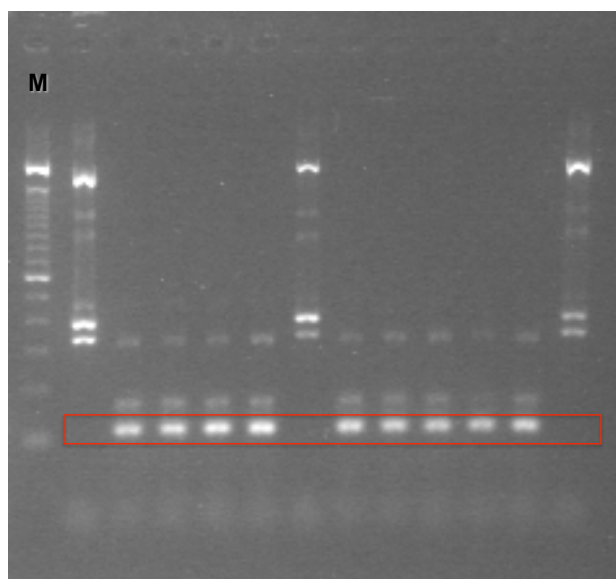
**Tabela XIV** – Condições da reacção de PCR *Colony* utilizado para detectar as colónias sem segmento genético inserido no plasmídeo

Mistura de reacção		Condições de Incubação	
Reagente	Volume (µl)	Fase	
Água livre nucleases	12,9	Desnaturação inicial	2 m a 94°C
Primer plasmPol <sup>1</sup>	1		Reacção da Polimerase em cadeia 30 ciclos
Primer plasmMT <sup>1</sup>	1		Desnaturação 30 s a 94°C
Tampão	2	Hibridação	30 s a 45°C
dNTPs	0,4	Extensão	2m30s a 72°C
MgCl <sub>2</sub>	0,6	Extensão final	10 m a 72°C
Taq polimerase	0,1		

1 – plasmPol – 5' GAGGTATATCTTTTCG 3'; plasmMT – 5' GTGTCGCCCGGAGTACTGGTC 3'; primers a uma concentração de 10 µM

Na mistura de reacção do PCR *Colony* foram utilizados dois primers, *Plasmpol* e *PlasmMT*, que vão hibridar em dois locais que delimitam a zona de inserção no plasmídeo utilizado. Assim, a utilização destes primers no PCR *Colony* irá dar origem a um segmento de 113 pb no caso de o segmento a clonar não ter sido introduzido no plasmídeo. As condições de amplificação do PCR *Colony* encontram-se resumidas na Tabela XIV e os resultados foram revelados por electroforese em gel de agarose 1,5% em TAE. Neste PCR, devido à interferência do DNA das células *E. Coli OneShot TOP10* quimicamente competentes, existem amplificações inespecíficas e a interpretação dos resultados deste PCR é apenas indicativo das possíveis colónias de bactérias com plasmídeos com o segmento genético viral inserido. Este passo é apenas utilizado para detectar as colónias não negativas, ou seja, as colónias com a possibilidade de terem o segmento viral inserido no plasmídeo e que serão posteriormente analisadas (Figura 22). Os tubos *falcon* correspondentes às colónias não negativas foram retirados do frio aos quais foram adicionados 5 ml de meio LB líquido com ampicilina (concentração final 100 µg/ml) e estes foram deixados a incubar durante a noite a 37°C com agitação de 150-200 rpm.





**Figura 22** – Exemplo de um gel de electroforese de um PCR *Colony*. A caixa a vermelho indica a zona da banda de 113 pb indicativa de ausência de inserção do segmento genético no plasmídeo. As colónias com a ausência desta banda são analisadas para confirmar a inserção do segmento genético. **M** – Marcador de pesos moleculares de 100bp (cada banda do marcador indica um incremento de 100bp)

#### 4.5.1.5 Confirmação da inserção do segmento genético no plasmídeo

A confirmação da inserção do segmento genético no plasmídeo é feito recorrendo à digestão do plasmídeo com a enzima de restrição *XbaI* e, de acordo com o tamanho dos fragmentos obtidos após esta digestão, confirma-se o sucesso da inserção do segmento genético viral no plasmídeo bidireccional de expressão.

Para esta confirmação é necessário extrair o DNA plasmídico da suspensão de bactérias deixadas a incubar durante a noite após o PCR *Colony*. O DNA plasmídico é extraído recorrendo ao kit comercial *QIAprep spin miniprep kit* (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. Neste protocolo, 3 ml (2 x 1,5 ml) da suspensão é concentrada num *pellet* recorrendo a um *spin*, na centrífuga, de cerca de 10 segundos descartando-se o sobrenadante. O *pellet* obtido é ressuspenso em 250 µl de Tampão P1 que tem na sua constituição sais e RNase. Após a ressusensão e homogeneização da solução são adicionados 250 µl de tampão de lise P2 (que tem na sua constituição SDS para a destruição das membranas) e por fim são adicionados 350 µl de tampão N3, constituído maioritariamente por ácido acético, que vai neutralizar o tampão de lise. Após uma centrifugação de 10 minutos a 17 900 x g, o sobrenadante é transferido para a coluna que vai capturar o DNA plasmídico na membrana de sílica. A membrana é depois lavada com 500 µl de

tampão PB, para remover algum vestígio de actividade das nucleases, e com 750 µl de tampão PE. Por fim, o DNA plasmídico é recuperado da membrana utilizando tampão de eluição.

Após a extracção do DNA plasmídico procede-se à digestão deste com a enzima de restrição *XbaI*. Nesta digestão, a 2 µl de DNA plasmídico extraído são adicionados 1 µl de tampão 4, 0,5 µl de enzima *XbaI* (New England Biolabs® Inc) e 6,5 µl de água estéril livre de nucleases. A reacção é colocada a incubar a 37°C, durante 1h30, e o padrão de restrição é analisado por electroforese em gel de agarose 1,5% em TAE com brometo de etídio incorporado e a utilização de um marcador de pesos moleculares *1kb DNA Ladder*. Na Tabela XV encontra-se resumido o padrão de restrição previsto para cada segmento genético. Sempre que o padrão de restrição não coincidiu com o previsto, foi efectuada a análise de outro clone com resultado não negativo no PCR Colony.

**Tabela XV –** Tamanho previsto dos fragmentos (pb) da digestão com a enzima de restrição *XbaI* do plasmídeo *pCIPollSapIT* com a inserção de cada um dos segmentos genéticos virais e com o gene da proteína GFP

Gene	A/Portugal/82/2009	B/Lisboa/08/2006	Gene	A/Portugal/82/2009	B/Lisboa/08/2006
PB2	4006	4006	NP	4006	4006
	2747	2802		1971	2250
PB1	4006	4006	NA	4006	4006
	2300	1805		1864	1911
PA	442	970	MP	4006	4006
	4006	4006		1433	1595
	2639	1601	NS	4006	4006
		502		1296	1499
HA		306	GFP	4006	
		302		1021	
	4006	4006		332	
	971	2263			
	880				
	333				

#### 4.5.1.6 Confirmação da sequência nucleotídica do segmento genético inserido no *pCIPollSapIT*

Após a análise e confirmação do padrão de restrição com a enzima *XbaI*, os clones foram sujeitos a uma sequenciação de confirmação de modo a garantir que o segmento inserido no plasmídeo bidireccional de expressão tem a mesma sequência nucleotídica que o segmento viral que lhe deu origem. O DNA plasmídico do eluído contendo o clone a confirmar foi quantificado de acordo com o procedimento descrito anteriormente para a quantificação de DNA. 200 ng de DNA plasmídico foram utilizados em cada uma das reacções de sequenciação cíclica utilizando inicialmente os primers *PlasmPol* (5' GAGGTATATCTTTTCG 3') e *PlasmMT* (5' GTGTCGCCCGGAGTACTGGTC 3') de acordo com as condições descritas na Tabela XVI. Como descrito anteriormente, os produtos da reacção de sequenciação cíclica foram enviados para a UTI-INSA onde foi efectuada a sua purificação, corrida da electroforese de capilares e uma primeira análise e edição das sequências.

Recorrendo ao programa informático *Seqman* as sequências obtidas foram analisadas juntamente com a sequência original do segmento viral de modo a detectar alguma mutação não sinónima no clone. Sempre que se observou uma sequência nucleotídica semelhante ao segmento viral original e sempre que a utilização dos *primers PlasmPol* e *PlasmMT* não foi suficiente para cobrir toda a sequência nucleotídica, repetiu-se a reacção de sequenciação cíclica desta vez utilizando o(s) *primer(s)* interno(s) descritos na Tabela III (A/Portugal/82/2009) e na Tabela VIII (B/Lisboa/08/2006) mais adequado(s) para se obter a sequência de mais uma porção do gene clonado. Este procedimento foi repetido sempre que se verificou que a sequência obtida era igual à original e que uma zona do segmento clonado ainda estava sem sequência nucleotídica confirmada.

Sempre que se observaram clones com mutações não sinónimas, procedeu-se à análise de outro clone positivo no padrão de restrição da *XbaI*.

**Tabela XVI** – Composição da mistura de reacção de sequenciação cíclica utilizada na sequenciação dos clones e respectivas condições de reacção.

Mistura de reacção		Condições de incubação	
Reagente	Quantidades	Fase	
Mastermix BigDye Primer (3,2 µM) Água DNA Plasmídico	0,5 µl 1,5 µl até 10 µl 200 ng	Desnaturação inicial	4 m a 96°C
		Reacção da Polimerase em cadeia	30 ciclos
		Desnaturação	10 s a 96°C
		Hibridação	5 s a 40-50°C <sup>1</sup>
		Extensão	4 m a 60°C
		Extensão final	8 m a 60°C

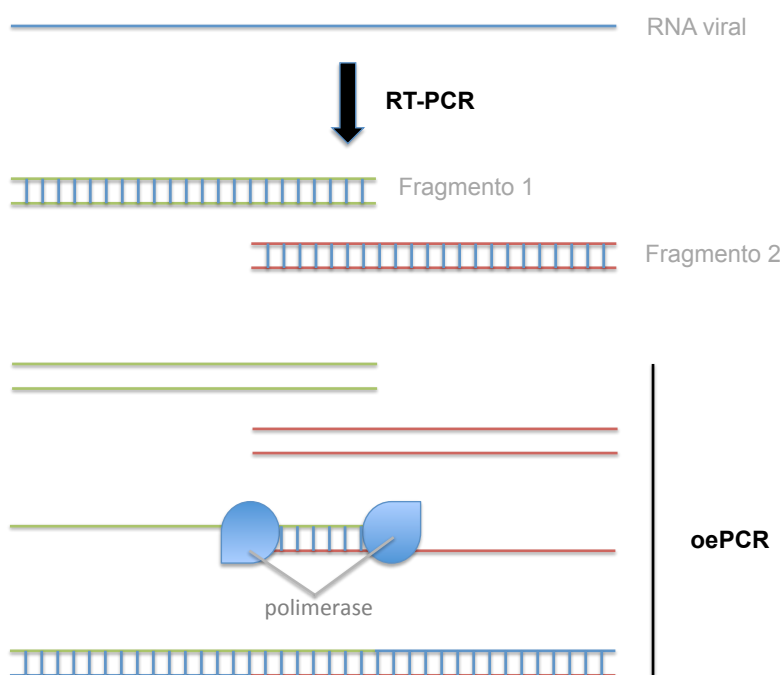
<sup>1</sup> – Foi utilizada uma temperatura de hibridação de 40°C na reacção de sequenciação cíclica com o *primer PlasmPol*, com os restantes primers a temperatura de hibridação foi de 50°C

#### 4.5.1.7 Constituição de stocks dos genes clonados

Todos os clones positivos com a sequência correcta foram conservados para uso posterior. O DNA plasmídico purificado foi conservado a -80°C e, do restante volume de propagado foram efectuadas duas aliquotas de stock em glicerol. Para tal, em dois criotubos foram misturados 850 µl de propagado com 150 µl de glicerol, após homogeneização da solução, os criotubos foram colocados a -20°C durante a noite e depois a -80°C. O stock em glicerol dos clones permite que a qualquer altura se possa utilizar este stock para propagar novas colónias e recuperar o DNA Plasmídico.

#### 4.5.2 Amplificação dos segmentos genéticos grandes por oePCR

A aplicação do protocolo de clonagem descrito anteriormente, demonstrou que a transcrição e amplificação dos segmentos virais maiores não era bem sucedida, mesmo utilizando transcriptases reversas optimizadas para a transcrição de fragmentos grandes ou para a transcrição a temperaturas mais elevadas (que permite uma melhor linearização do RNA a ser transcripto) assim como através da utilização combinada destas enzimas com polimerases optimizadas para a amplificação de segmentos grandes. A amplificação dos segmentos virais maiores só foi bem sucedida recorrendo ao oePCR. Nesta reacção, são transcritos e amplificados dois fragmentos do segmento viral que contenham uma sobreposição entre eles. Numa segunda reacção, estes fragmentos vão servir de *primers* e de *template* um do outro e a restante parte do fragmento é extendida pela DNA polimerase (Figura 23).



**Figura 23** – Representação esquemática da estratégia de transcrição e amplificação dos segmentos genéticos virais maiores por oePCR. Numa primeira reacção são transcritos e amplificados por RT-PCR dois fragmentos com uma sobreposição na sequência nucleotídica. Numa segunda reacção estes fragmentos vão ser utilizados como *primers* e *template* um do outro para a extensão do fragmento pela DNA polimerase.

Para a amplificação dos segmentos virais cuja transcrição e amplificação não foi bem sucedida com a metodologia descrita no ponto 4.5.1.1, começou-se por transcrever e amplificar dois fragmentos de cada segmento genético utilizando conjuntos de *primers*, descritos na Tabela XVII, utilizando o kit

comercial *QIAGEN OneStep RT-PCR* com as condições de transcrição reversa e de amplificação descritas na Tabela XII. Após a confirmação da amplificação em electroforese em gel de agarose 1,5% em TAE, os produtos amplificados foram purificados com o kit comercial *QIAquick PCR purification kit* e quantificados como descrito anteriormente. Para a reacção de oePCR foram utilizados 1000 ng de DNA na proporção molar de 1:1 de fragmento 1:fragmento 2 a DNA polimerase *Pfx* (Invitrogen, Life Technologies) e as condições de reacção descritas na Tabela XVIII.

**Tabela XVII** – Tabela de primers utilizados para a amplificação de cada fragmento utilizado no oePCR, para cada segmento viral.

	A/Portugal/82/2009		B/Lisboa/08/2006	
	Fragmento 1	Fragmento 2	Fragmento 1	Fragmento 2
<b>PB2</b>	PB2uniSapIF <sup>1</sup> + PB2_1519R <sup>2</sup>	PB2_946F <sup>2</sup> + PB2uniSapIR <sup>1</sup>	BPB2F1U_SAP <sup>1</sup> + BPB2_1233R <sup>3</sup>	BPB2_857F <sup>3</sup> + BPB2REU_SAP <sup>1</sup>
<b>PB1</b>	PB1uniSapIF <sup>1</sup> + PB1_1042R <sup>2</sup>	PB1_974F <sup>2</sup> + PB1uniSapIR <sup>1</sup>	BPB1F1U_SAP <sup>1</sup> + BPB1_1255R <sup>3</sup>	BPB1_1031F <sup>3</sup> + BPB1REU_SAP <sup>1</sup>
<b>PA</b>	PAuniSapIF <sup>1</sup> + PA_1292R <sup>2</sup>	PA_894F <sup>2</sup> + PAuniSapIR <sup>1</sup>	BPAF1U_SAP <sup>1</sup> + BPA_1392R <sup>3</sup>	BPA_803F <sup>3</sup> + BPAREU_SAP <sup>1</sup>
<b>HA</b>	HAuniSapIF <sup>1</sup> + HA_943R <sup>2</sup>	HA_736F <sup>2</sup> + HAuniSapIR <sup>1</sup>	BHAF1U_SAP <sup>1</sup> + BHA_1168R <sup>3</sup>	BHA_868F <sup>3</sup> + BHAREU_SAP <sup>1</sup>
<b>NP</b>	NPuniSapIF <sup>1</sup> + NP_1042R <sup>2</sup>	NP_619F <sup>2</sup> + NPuniSapIR <sup>1</sup>	BNPF1U_SAP <sup>1</sup> + BNP_1126R <sup>3</sup>	BNP_308F <sup>3</sup> + BNPREU_SAP <sup>1</sup>
<b>NA</b>	NAuniSapIF <sup>1</sup> + NA_1063R <sup>2</sup>	NA_941F <sup>2</sup> + NAuniSapIR <sup>1</sup>	BNAF1U_SAP <sup>1</sup> + BNA_653R <sup>3</sup>	BNA_495F <sup>3</sup> + BNAREU_SAP <sup>1</sup>

1 – sequência dos primers descrita na Tabela XIII; 2 – Sequência do primer descrita na Tabela III sem a terminação M13; 3 - sequência dos primers descrita na Tabela VIII

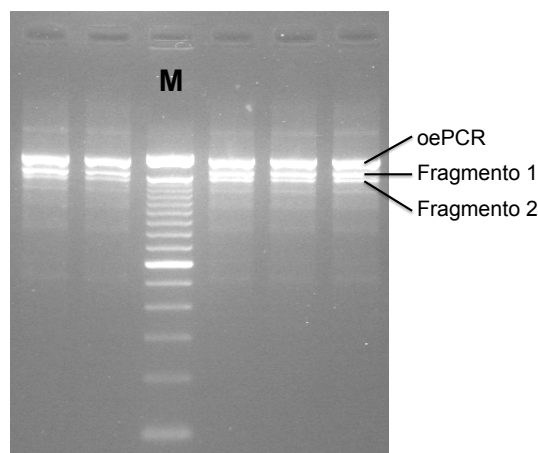
**Tabela XVIII** – Composição da mistura de reacção de oePCR utilizada na amplificação dos segmentos virais maiores e respectivas condições de reacção

Mistura de reacção		Condições de incubação	
Reagente	Quantidades	Fase	
Buffer	15 µl	Desnaturação inicial	4 m a 94°C
dNTPs (10mM)	4 µl	Reacção da Polimerase em cadeia	35 ciclos
MgSO <sub>4</sub>	2 µl	Desnaturação	40 s a 94°C
PCR enhancer	10 µl	Hibridação	30 s a 60°C
Pfx polimerase	1 µl	Extensão	2m30s m a 68°C
DNA (Fragmento 1 + Fragmento 2; 1:1)	1000 ng	Extensão final	10 m a 68°C
Água livre nucleases	perfazer 100 µl		

Todo o produto resultante da reacção do oePCR foi aplicado num gel de agarose 1,5% em TAE e a banda contendo o segmento viral amplificado foi removida do gel, com o auxílio de um bisturi, e o DNA foi recuperado utilizando o kit *QIAquick Gel extraction kit* como descrito anteriormente (Figura 24).

No caso dos segmentos genéticos PA da estirpe A/Portugal/82/2009, PB2, HA e NA da estirpe B/Lisboa/08/2006 amplificados por oePCR, os respectivos purificados foram digeridos com a enzima de restrição *SapI*, como descrito anteriormente, e o restante processo de clonagem do segmento viral no plasmídeo bidireccional de expressão *pCIPolI/SapIT* foi o mesmo ao utilizado anteriormente

(do ponto 4.5.1.2 ao ponto 4.5.1.7). Os restantes segmentos genéticos, por conterem uma ou mais zonas de restrição da enzima *SapI*, tiveram que ser clonados no plasmídeo TOPO TA.



**Figura 24** – Gel de electroforese do resultado do oePCR do segmento genético HA da estirpe B/Lisboa/08/2006. O produto total da reacção de oePCR foi dividido por 5 poços para facilitar a sua remoção do gel de electroforese. Em cada poço dá para identificar duas bandas correspondentes a cada um dos fragmentos utilizados na reacção de oePCR e uma banda maior correspondente ao segmento viral amplificado. M – Marcador de pesos moleculares de 100bp (cada banda do marcador indica um incremento de 100bp)

#### 4.5.3 Clonagem dos segmentos genéticos grandes com zona(s) de restrição da enzima *SapI*

Nos segmentos genéticos virais que apresentam uma (ou mais) zona(s) de restrição da enzima *SapI* (PB2, PB1 e PA da estirpe A/Portugal/82/2009, PB1, PA, NP e M da estirpe B/Lisboa/08/2006) na sua sequência passamos de uma ligação de duas peças (segmento e plasmídeo) para uma ligação de três (ou mais) peças. Esta alteração faz com que o sucesso de ligação seja mais baixo, tornando mais difícil a obtenção de um clone com o segmento genético viral desejado, completo, ligado ao plasmídeo. A solução para contornar este problema passou por clonar o fragmento resultante do oePCR no plasmídeo comercial 2.1-TOPO (Invitrogen, Life Technologies). Este passo permite ter o segmento viral na forma de plasmídeo, altamente estável e acessível à DNA polimerase, permitindo assim uma boa amplificação do gene completo (concentração de DNA muito superior à obtida por oePCR). O produto desta amplificação é então sujeito a uma digestão parcial com a enzima de restrição *sapI*. Desta digestão parcial do segmento resultam várias combinações de segmentos digeridos, entre os quais estará o segmento inteiro digerido apenas nas extremidades. Este segmento será o único que terá as extremidades coesivas competentes com as extremidades coesivas do plasmídeo *pCIPollSapIT*.

O plasmídeo comercial 2.1-TOPO é fornecido na forma linear com uma timina em cadeia simples em cada extremidade 3'. Com a adição de um produto de PCR a este plasmídeo a timina vai ligar-se à adenina em cadeia simples deixada nas extremidades 3' do produto de PCR pela *taq* DNA polimerase e fechar o plasmídeo.

No caso do produto amplificado por oePCR, a inserir no plasmídeo 2.1-TOPO, foi necessário acrescentar a adenina em cadeia simples em cada extremidade 3' do produto de PCR, pois a enzima utilizada no oePCR foi a *Pfx* DNA polimerase. Assim, ao produto purificado resultante do oePCR (30 µl) foram adicionados 0,4 µl de *taq* DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies), 5 µl de tampão da *taq* DNA polimerase, 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> e 1 µl de dATP (Roche, Barcelona, Espanha). O volume total de 50 µl foi perfeito com água livre de nucleases e a mistura foi colocada a 72°C, durante 10 minutos, seguido de um banho de gelo. A reacção de ligação do DNA ao plasmídeo 2.1-TOPO foi efectuada de imediato, adicionando 1 µl de 2.1-TOPO e 1 µl de *salt solution* a 4 µl de DNA. A ligação ocorreu deixando a mistura à temperatura ambiente durante 30 minutos. Os 2 µl do produto desta ligação foram utilizados para transformar células *E. Coli OneShot TOP10* quimicamente competentes como descrito no ponto 4.5.1.3. O produto da transformação foi espalhado em placas, com meio LB sólido com ampicilina, às quais previamente foram adicionados 40 µl de *Xgal* a 40mg/ml (Invitrogen, Life Technologies). Esta adição vai permitir distinguir as colónias positivas (brancas) das negativas (azuis)<sup>5</sup>. As colónias brancas foram propagadas em meio LB líquido com ampicilina e o DNA plasmídico foi extraído como descrito anteriormente. A inserção do produto de PCR foi confirmado por sequenciação.

Após a confirmação da inserção e da sequência do produto inserido, procedeu-se à reacção de PCR descrita no ponto 4.5.1.1 utilizando como *template* 2 µl de DNA plasmídico (2.1TOPO-Producto PCR) e removendo o passo correspondente à transcrição reversa. O produto de PCR foi analisado por electroforese em gel de 1,5% de agarose em TAE, purificado utilizando o kit *QIAquick PCR purification kit* e quantificado, como descrito anteriormente.

O produto de PCR foi então parcialmente digerido com a enzima de restrição *SapI*, adicionando a 44,5 µl do purificado do PCR, 5 µl de tampão e 0,5 µl de enzima *SapI* (cerca de ¼ do necessário para uma digestão completa). Esta mistura de reacção foi deixada a 37°C durante 1h. O produto

---

<sup>5</sup> A zona de inserção do produto de PCR no plasmídeo 2.1-TOPO quebra o gene *LacZα*. Quando o gene *LacZ* é transcrito (ausência de inserção do produto de PCR), vai ocorrer a activação da *β-galactosidase* que faz com que o *Xgal* seja convertido num produto de cor azul. Assim, é possível detectar as colónias com o produto de PCR inserido (colónias brancas), das restantes colónias (cor azul).

digerido foi purificado com o kit *comercial QIAquick PCR purification kit* como descrito anteriormente e quantificado. A reacção de ligação do produto amplificado digerido ao plasmídeo *pCIPollSapIT* digerido foi efectuada como descrito no ponto 4.5.1.2 utilizando uma razão molar de plasmídeo:fragmento de 1:5<sup>6</sup>. Após a reacção de ligação, todo o procedimento efectuado é igual ao descrito anteriormente do ponto 4.5.1.3 ao ponto 4.5.1.7.

#### **4.5.4 Recuperação de vírus através dos plasmídeos**

De modo a verificar se todos os plasmídeos foram bem construídos recorreu-se à transfecção de células com os 8 plasmídeos contendo cada um dos 8 segmentos genéticos de cada vírus influenza. No caso de todos os plasmídeos estarem funcionais, será possível recuperar partículas virais a partir das células transfectadas.

Na transfecção, são necessários 1000 ng de cada plasmídeo por cada reacção de transfecção. No entanto, durante o processo de transfecção foram sempre testadas 6 condições diferentes de transfecção sendo assim necessário um total de 6000 ng de cada plasmídeo. Para se obter esta quantidade de plasmídeo purificado, o stock de glicerol de cada plasmídeo foi plaqueado, com gradiente, em meio LB sólido com ampicilina, com o auxílio de uma ansa. As placas foram deixadas a incubar durante a noite, a 37°C, e foi recolhida de cada placa uma colónia, bem individualizada, que foi colocada a propagar durante a noite, a 37°C, com agitação, em 10 ml de meio LB líquido com ampicilina. Para a extracção do DNA plasmídico, os 10 ml de propagado foi centrifugado recorrendo a um *spin*, na centrífuga, e a extracção do plasmídeo foi efectuada recorrendo ao kit comercial *QIAprep spin miniprep kit* com uma alteração ao protocolo (prevista pelo fabricante) em que para uma quantidade elevada de bactérias é utilizado o dobro do volume dos tampões. Esta alteração ao protocolo permite ter uma maior concentração de DNA plasmídico no eluído final.

Para a transfecção, com 24h de antecedência, foram preparadas placas de 6 poços com co-cultura de células 293T e células MDCK-SIAT1 como descrito no ponto 4.3.1.3. Na transfecção foram utilizadas 3 quantidades diferentes de *Lipofectamine® 2000* (Invitrogen, Life Technologies) para duas quantidades de Tripsina-TPCK. Assim, prepararam-se três diluições de *Lipofectamine® 2000*: 5, 10 e 15 µl, por poço; adicionando, em tubos separados, 10, 20 e 30 µl de *Lipofectamine® 2000* a 400 µl

---

<sup>6</sup> De salientar que esta razão molar não vai ser a real pois no produto parcialmente digerido vamos ter uma mistura de fragmentos digeridos onde apenas uma porção desconhecida corresponde ao segmento viral digerido nas extremidades e que se irá ligar ao plasmídeo.



de OPTIMEM (Gibco), respectivamente. Noutro tubo foram adicionadas 6 µg de cada plasmídeo (8 plasmídeos cada um contendo um segmento genético do vírus) a 1,2 ml de OPTIMEM. Passados 5 minutos, à temperatura ambiente, adicionou-se 400 µl da mistura “OPTIMEM + plasmídeos” a cada um dos tubos contendo a mistura “OPTIMEM + *Lipofectamin2® 2000*”, uniformizou-se a mistura e deixou-se a incubar durante 20 minutos, à temperatura ambiente, para permitir a ligação dos plasmídeos às moléculas de *Lipofectamine® 2000*. Durante estes 20 minutos, removeu-se o meio de crescimento das células, lavaram-se as células duas vezes com 1 ml/poço de OPTIMEM previamente aquecido a 37°C e adicionou-se a cada poço 1 ml de OPTIMEM. Após os 20 minutos de incubação foram adicionados, gota a gota e em duplicado, 400 µl da mistura “*Lipofectamine® 2000* + plasmídeos” aos respectivos poços. A placa com as células foi colocada numa estufa a 37°C com atmosfera húmida e 5% CO<sub>2</sub>. Passadas 4 horas, o meio das células foi substituído por meio de infecção contendo 1,5 e 3 µg/ml de tripsina-TPCK. Ao final de 24 horas, determinou-se o título hemaglutinante do sobrenadantes de cada poço e procedeu-se à inoculação de 200 µl de cada sobrenadante em tubos CT de células MDCK-SIAT1 preparadas anteriormente para infecção. A destruição da monocamada celular foi monitorizada diariamente e quando se observou destruição, a presença de vírus nos sobrenadantes foi confirmada recorrendo à reacção de hemaglutinação. Este procedimento foi efectuado em separado para a recuperação através de plasmídeos do vírus influenza do tipo A e do vírus influenza do tipo B. Em ambos os casos a reacção de hemaglutinação deu negativo em todos os poços das placas transfectadas. Dos isolamentos efectuados com o sobrenadante dos poços, no caso do vírus do tipo A, 3 dos 6 tubos apresentaram um título hemaglutinante ≥8 e no caso do vírus do tipo B um dos tubos apresentou um título hemaglutinante de 4. Os resultados da hemaglutinação reflectem uma replicação viral indicando que os plasmídeos utilizados para a recuperação dos vírus estão funcionais.

Em suma, com o trabalho laboratorial descrito neste capítulo, (1) foram constituídos os stocks virais das duas estirpes de vírus influenza a serem utilizadas nos estudos cinéticos da apoptose, uma estirpe de vírus influenza do tipo A e outra de vírus influenza do tipo B; (2) foram implementadas técnicas no laboratório que permitiram titular a dose infecciosa de cada stock viral, de modo a ser possível igualar a dose infecciosa de cada stock viral nos ensaios do estudo da apoptose; e (3) foi

construída uma biblioteca contendo todos os genes de um vírus influenza do tipo A e do tipo B para serem utilizados no estudo do efeito de cada gene na cinética da apoptose.

## **5 Apoptose na infecção por vírus influenza do tipo A e do tipo B**

A maioria dos resultados presentes neste capítulo foram publicados no artigo:

- **Santos LA**, Sola S, Rodrigues CM, Rebelo-de-Andrade H. *Distinct kinetics and pathways of apoptosis in influenza A and B virus infection*. Virus Res, 2015. 205: 33-40;

Toda a metodologia descrita neste capítulo foi executada pelo autor da tese, Luis André Santos. A parte da análise da morte celular, apoptose, extracção e análise proteica teve um acompanhamento teórico-prático inicial da Prof. Doutora Susana Solá.

## 5.1 Resumo

Para detectar as diferenças no perfil de indução da apoptose pelos vírus influenza do tipo A e do tipo B, células MDCK-SIAT1 foram infectadas com os stocks virais preparados anteriormente e diluídos à mesma dose infecciosa. Nestas células infectadas foram analisadas a cinética e as vias de indução da apoptose por libertação da enzima lactato desidrogenase (LDH), coloração de Hoescht, actividade das caspases e análise da expressão de proteínas.

Os resultados mostraram diferenças na indução da apoptose na infecção com o vírus do tipo A e o do tipo B. O vírus do tipo A induziu a apoptose nas células infectadas numa fase tardia da infecção, e esta indução da apoptose deu-se maioritariamente pela via intrínseca. O vírus influenza do tipo B induziu a apoptose numa fase inicial da infecção recrutando ambas as vias, a via intrínseca e a via extrínseca.

O estudo das vias celulares, através da análise de expressão de proteínas, ao contrário do esperado, mostrou que a via de sobrevivência do Akt estava activa na infecção por ambos os vírus. Assim, foi necessário verificar qual das vias de sobrevivência activadas pelo Akt poderia justificar os resultados obtidos anteriormente. Esta análise apontou a activação da via do NF- $\kappa$ B pelo vírus influenza do tipo A como uma possível causa para as diferenças observadas na indução da apoptose pelos dois vírus. A activação do NF- $\kappa$ B na infecção com o vírus A foi confirmada por ensaios de actividade do NF- $\kappa$ B e pela análise das proteínas anti-apoptóticas expressas pelo NF- $\kappa$ B. De facto, na infecção com os vírus do tipo A foi detectada uma maior expressão das proteínas inibidoras da apoptose Bcl-XL e XIAP, comparativamente com a infecção com os vírus do tipo B.

No estudo dos componentes virais que poderiam influenciar a diferença na indução da apoptose observada para os dois vírus, começou-se por analisar o efeito da transfecção de células com o gene NS1A e NS1B na translocação do NF- $\kappa$ B do citoplasma celular para o núcleo por imunocitoquímica. No entanto, devido à baixa taxa de transfecção conseguida, os resultados não foram conclusivos. Na medição da actividade das caspases efectores em células transfectadas com cada um dos segmentos genéticos do vírus influenza do tipo A e do tipo B, verificou-se que a maioria das proteínas/RNAs virais do vírus influenza do tipo B induzem a apoptose nas células, enquanto que no vírus influenza do tipo A foi observada uma inibição da apoptose pelas proteínas/RNAs virais M, NS e PB1.

## **5.2 Metodologias aplicadas**

### **5.2.1 Infecção de células MDCK-SIAT1 com os vírus stock**

#### 5.2.1.1 Preparação das células

Para os ensaios de morte celular, apoptose e análise de proteínas foi necessária a preparação de culturas celulares de maneiras diferentes. Nomeadamente, o estudo da enzima LDH e das células morfologicamente em apoptose foi realizado em células semeadas em placas de Petri de 3,3 cm<sup>2</sup> de diâmetro, o estudo da actividade das caspases foi realizado em células semeadas em placas de 96 poços, e para a expressão das proteínas as células foram semeadas em frascos de cultura celular T25. Em todos os casos foram utilizadas células MDCK-SIAT1 numa densidade  $2-4 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> de modo a obter uma confluência da monocamada de 80-90% ao final de 48h (excepto nas células utilizadas no estudo da actividade das caspases onde não é aconselhável o uso de mais de 60 000 células/poço). O número de placas/poços/frascos a preparar teve sempre em conta o número de estirpes de vírus/controlo a inocular, os diversos tempos pós infecção em estudo e 2 placas/poços/frascos extra para a contagem de células antes da inoculação.

De modo a uniformizar as condições de inóculo entre ensaios e estirpes virais, foi necessário contabilizar o número de células antes do processo de inoculação. Assim, as células das 2 placas/poços/frascos extra foram lavadas duas vezes com DPBS e tripsinizadas até ao descolamento total da monocamada, adicionado meio suplementado com 10% de FBS e homogeneizada a suspensão celular para a contagem celular como descrito anteriormente.

#### 5.2.1.2 Inoculação dos vírus

Em todos os ensaios foi utilizada uma dose infecciosa de inóculo de 0,01 MOI com base nas titulações de TCID<sub>50</sub>, ou seja, uma dose infecciosa inicial de 0,01 TCID<sub>50</sub>/célula. Para tal, antes da inoculação das células MDCK-SIAT1 utilizadas nos vários ensaios, os vírus stock (A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006) foram diluídos em meio suplementado de modo a apresentarem, no inóculo utilizado, uma dose infecciosa de 0,01 TCID<sub>50</sub> por célula (contabilizadas através da metodologia descrita no ponto anterior).

No início de cada ensaio, a monocamada de células MDCK-SIAT1 com 48h de crescimento e com uma confluência de 80-90% nas placas/poços/frascos foi lavada com meio suplementado, de modo a remover o FBS, que inibe a replicação do vírus influenza, e foram adicionados 300 µl nas placas de

Petri, 50 µl por poço nas placas de 96 poços e 1 ml nos frascos T25 de inóculo de A/Portugal/82/2009, B/Lisboa/08/2006 e meio suplementado (controlo negativo). Foram inoculados inicialmente o número de placas/poços/frascos de modo a ter uma placa de Petri/placa de 96 poços/frasco T25 por vírus e por cada *timepoint* em estudo. O inóculo foi deixado em contacto com a monocamada celular durante 30 minutos à temperatura ambiente, no final do qual foi removido e adicionados 2 ml/100 µl/7 ml de meio de infecção às placas de Petri/placas de 96 poços/frascos T25 inoculados e estes foram colocadas a 37°C numa estufa com CO<sub>2</sub>. Nesse momento, ficou definido o tempo zero horas pós-infecção.

### **5.2.2 Ensaios de morte celular e apoptose**

A análise da morte celular e das células morfológicamente em apoptose foi efectuada utilizando placas de Petri, enquanto que a actividade das caspases foi medida em placas de 96 poços. Nas três metodologias foram analisados os tempos 8, 24, 32, 48, 56 e 72 horas pós-infecção (hpi). Em cada tempo pós-infecção foram removidas da estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C uma placa de Petri infectada com cada uma das estirpes em estudo e uma placa de Petri controlo (para a análise da enzima LDH e células morfológicamente em apoptose). Nas placas de 96 poços (actividade das caspases) foi removida apenas uma das placas, pois foi possível incluir todas as condições em apenas uma placa.

#### **5.2.2.1 Libertação da enzima LDH**

A análise da libertação da enzima LDH foi efectuada recorrendo ao kit comercial *CytoTox96® Non-Radioactive Cytotoxicity assay* (Promega) conforme as instruções recomendadas pelo fabricante. A enzima LDH é uma enzima citoplasmática que, quando ocorre lise celular ou quando a integridade da membrana celular é comprometida, é liberta para o sobrenadante extracelular. Este kit comercial mede, indirectamente, a morte celular total através da conversão do sal tetrazólio num produto formazan vermelho na presença de NADH, reduzido a partir do NAD pela LDH. A cor produzida nesta reacção poderá ser medida através da leitura da absorvância a 490nm. A intensidade de absorvância medida será proporcional ao número de células lisadas (morte celular).

Em cada *timepoint* em estudo (8, 24, 32, 48, 56 e 72 hpi), uma placa de Petri infectada com o vírus A/Portugal/82/2009, uma placa de Petri infectada com o vírus B/Lisboa/08/2006 e uma placa de Petri controlo foram removidas da estufa de CO<sub>2</sub>. O sobrenadante das placas foi removido das placas de

Petri e centrifugado a 250 x g, durante 4 minutos, de modo a descartar todos os detritos celulares. As placas de Petri contendo apenas as células foram tratadas para a análise morfológica do número de células em apoptose (ponto 5.2.2.2). De cada condição, foram pipetados 50 µl, em triplicado, para cada orifício de uma placa de 96 poços. A todos os poços foram adicionados 50 µl de mistura de substrato (componente do kit) e a placa foi colocada a incubar no escuro à temperatura ambiente durante 30 minutos, no final dos quais foram adicionados 50 µl de solução stop (componente do kit) a todos os poços e a absorvância da reacção foi lida no leitor de placas FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Madrid, Espanha) com o filtro de absorvância de 490 nm.

#### 5.2.2.2 Morfologia de células em apoptose

As células morfológicamente em apoptose podem ser facilmente observadas por microscopia, pois uma das características das células em apoptose é apresentarem núcleos com a cromatina condensada, contigua à membrana nuclear, assim como fragmentação nuclear. Por oposição, as células *normais* apresentam a cromatina distribuída uniformemente por todo o núcleo. Assim, para identificar a diferenciação das células, utilizou-se um fluorocromo específico da cromatina, Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich), que cora apenas os núcleos das células e permite a visualização da sua morfologia nuclear por microscopia de fluorescência.

Em cada tempo pós-infecção, após a remoção do sobrenadante para a análise da libertação do LDH, as placas de Petri contendo a monocamada celular foram lavadas três vezes com 1 ml de DPBS e as células foram fixadas e permeabilizadas utilizando 1 ml de 4% de paraformaldeído em DPBS, pH 7,4, durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após o tempo de fixação, as placas foram novamente lavadas três vezes com DPBS e coradas com 1 ml de fluorocromo Hoechst 33258 a 5 µg/ml em DPBS, durante 5 minutos no escuro, e à temperatura ambiente. Por fim, as placas foram novamente lavadas três vezes com DPBS para remover o excesso de corante e adicionados 20 µl de DPBS/glicerol (3:1, v/v) como meio de montagem antes da colocação da lamela. As placas foram visualizadas no microscópio de epifluorescência Axiokop (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) com filtro DAPI (comprimento de onda 360nm) e para cada placa foram capturados quatro campos aleatórios com o software Cytovision (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha). Em cada campo capturado foram categorizados e contabilizados todos os núcleos (núcleos em apoptose/normais, de acordo com a



condensação e características da cromatina) e os resultados expressos em percentagem da média dos quatro campos de núcleos em apoptose.

#### 5.2.2.3 Actividade das caspases

A actividade das caspases foi medida recorrendo ao sistema Caspase-Glo® da Promega. Trata-se de um ensaio que permite a medição da actividade das caspases, por luminescência, em células em cultura. Este sistema utiliza um substrato proluminescente para a caspase 3/7, 8 ou 9 que contém a sequência tetrapeptídica DEVD, LETD ou LEHD, respectivamente. Na presença das caspases, este substrato é clivado e ocorre a libertação de aminoluciferina, um substrato da luciferase que emitirá luminescência. O kit é constituído apenas por um reagente optimizado para a lise celular seguida pela clivagem do substrato, pelas caspases e formação de um sinal luminescente que poderá ser lido num aparelho de luminescência. O sinal de luminescência será proporcional à actividade da caspase em estudo.

Neste trabalho foram utilizados os kits Caspase-Glo® 3/7 (Promega) que mede a actividade das caspases efectoras 3/7, o kit Caspase-Glo® 8 (Promega) que mede a actividade da caspase 8, caspase iniciadora associada à activação da via extrínseca da apoptose e o kit Caspase-Glo® 9 (Promega) que mede a actividade da caspase 9, caspase iniciadora associada à activação da via intrínseca da apoptose. Foi seguido o protocolo “*in cell-based assay*” fornecido pelo fabricante.

Em cada tempo pós-infecção (8, 24, 32, 48, 56 e 72 hpi) foi removida uma placa de 96 poços da estufa de CO<sub>2</sub>, a 37°C, contendo três poços com células MDCK-SIAT1 infectadas com o vírus A/Portugal/82/2009, três com o vírus B/Lisboa/08/2006 e três com controlo negativo (meio suplementado). Num dos poços foi testada a actividade das caspases 3/7, noutro a actividade da caspase 8 e no terceiro, a actividade da caspase 9 (Figura 25). Ao poço correspondente, foram adicionados 100 µl dos reagentes Caspase-Glo® 3/7, 8 e 9, numa razão 1:1 (v/v) aos 100 µl do meio de infecção presentes no poço. A placa de 96 poços foi colocada num agitador de placas, a 500 rpm durante 30 segundos, e foi deixada a incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação a intensidade de luminescência foi medida no leitor de placas FLUOstar OPTIMA equipado com opção de leitura de luminescência.

			Caspases 3/7			Caspase 8			Caspase 9				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A													
B													
A/Portugal/82/2009	C												
D													
B/Lisboa/08/2006	E												
F													
Controlo	G												
H													

**Figura 25** – Representação esquemática da placa de 96 poços onde se indica a posição de distribuição das células inoculadas com os diferentes vírus, das caspases e do controlo para a medição da actividade das caspases 3/7, 8 e 9.

### 5.2.3 Análise de vias celulares envolvidas na apoptose induzida pelos vírus influenza

O estudo das proteínas e vias celulares envolvidas nas diferenças da indução da apoptose foi limitada às primeiras 24 hpi, por ter sido neste intervalo de tempo que se observou uma maior diferença na indução da apoptose entre a infecção com o vírus A/Portugal/82/2009 e o vírus B/Lisboa/08/2006.

#### 5.2.3.1 Extracção das proteínas

A extracção de proteínas foi efectuada nas células em monocamada semeadas em frascos T25 e infectadas com um MOI de 0,01 TCID<sub>50</sub>/célula, como descrito anteriormente. Foram infectados frascos com o vírus A/Portugal/82/2009, B/Lisboa/08/2006 e meio suplementado (controlo) em quadruplicado (um para cada tempo pós-infecção em estudo).

Para a recolha de todo o material celular, em cada tempo pós-infecção, 4, 8, 16 e 24 hpi, foi removido o sobrenadante para um tubo de centrifuga no qual foram também recolhidas todas as células aderentes no frasco, através da sua remoção com recurso a um raspador de células. Todo o material recolhido de cada frasco foi centrifugado a 600 x g durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi ressuscitado em 100 µl de tampão de lise (meio de manutenção com 1% de Triton-X (Sigma-Aldrich), e 1X do cocktail inibidor de proteases e fosfatases Halt™, Thermo Fisher Scientific Inc, Rockford, Illinois, EUA), vortexado e deixado em gelo durante 30 minutos. Este procedimento para além de libertar todo o conteúdo celular serve também para

inactivar as partículas virais. As amostras foram posteriormente sonicadas durante 30 segundos em ultrasons e centrifugadas a 3 200 x *g* durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante de cada amostra (extracto das proteínas celulares totais) foi recolhido, quantificado e conservado a -80°C até à sua utilização.

#### 5.2.3.2 Quantificação das proteínas

A quantificação das proteínas dos extractos celulares foi determinada com o kit comercial *Bio-Rad Protein Assay Kit* (Bio-Rad, Hercules, California, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Este kit baseia-se no método de quantificação proteica de Bradford, em que é utilizado o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* que se liga às proteínas presentes na amostra e altera o seu comprimento de onda de 465 nm para 595 nm. Assim, são utilizados vários padrões com concentrações conhecidas de proteína para construir uma recta de quantificação que permitirá calcular a concentração das amostras através da absorvância de cada amostra.

Para a construção da recta de quantificação, foram utilizadas várias quantidades da proteína BSA (0, 1, 5, 10, 20 e 25 µg) que foi diluída, em água miliQ, num volume total de 800 µl. Para a quantificação das amostras, foram adicionados 2 µl de extracto proteico de cada amostra a 798 µl de água miliQ. Todos os tubos (padrões e amostras) foram vortexados, adicionado 200 µl do reagente BioRad Assay dye e efectuada a leitura da absorvância a um comprimento de onda de 595 nm no espectrofotómetro Unicam UV/Vis Spectrometer UV4 (Unicam, Lisboa, Portugal). Com o recurso ao software informático *Microsoft Excel 2011* foi construída a recta de quantificação e respectiva equação da recta, com a qual foi calculada a concentração proteica de cada amostra.

#### 5.2.3.3 Análise das proteínas por immunoblot

##### *Preparação dos géis*

Para cada ensaio, foram preparados dois géis de poliacrilamida, um a 8% para revelar as proteínas de baixo peso molecular e outro a 12% para revelar as restantes proteínas (Tabela XIX).

Após homogeneização da mistura de cada gel, esta foi transferida para um molde vertical, deixando 1-2 cm do molde livres. Foi adicionada uma camada de isopropanol (Merck) à superfície do gel em polimerização de modo a facilitar a polimerização e evitar a formação de bolhas. Após a polimerização dos géis, foi removido o isopropanol e preparado o gel de concentração (gel de 4% -

Tabela XIX). O gel de concentração faz com que as amostras, no início da corrida, se concentrem e entrem no gel ao mesmo tempo. O gel de concentração a 4% foi adicionado até ao preenchimento total do molde de géis vertical e foi colocado o pente para a formação de poços. Durante a polimerização do gel de concentração, foram preparadas as amostras a carregar no gel.

**Tabela XIX** - Formulação dos reagentes e quantidades utilizadas em cada gel de poliácridamida

	Gel de 4%	Gel de 8%	Gel de 12%
Protogel <sup>1</sup>	1,3 ml	3,4 ml	5 ml
4X Lower buffer <sup>2</sup>	-	3,3 ml	3,3 ml
4X Upper buffer <sup>3</sup>	2,5 ml	-	-
Água	6,1 ml	5,8 ml	5 ml
APS <sup>4</sup>	50 µl	125 µl	125 µl
TEMED <sup>4</sup>	10 µl	12,5 µl	12,5 µl

<sup>1</sup>(National Diagnostics, Atlanta, Georgia, EUA)

<sup>2</sup>4X Lower buffer – 1,5 M Tris-HCl (Sigma), pH 8,8, 0,4% SDS (Bio-Rad)

<sup>3</sup>4X Upper buffer – 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,4% SDS

<sup>4</sup>(Merck)

#### *Preparação das amostras*

As amostras foram preparadas em duplicado (uma para ser carregada no gel de 8% e outra para o gel de 12%). Após o cálculo do volume de cada amostra correspondente a 20 µg de proteína total, o mesmo foi perfeito até aos 10 µl com tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,4 e 1 mM EDTA (Sigma), pH 8,0). Foi ainda adicionado a cada amostra 3 µl de tampão de desnaturação 5X (1,25 ml de 4X *upper buffer*, 2% SDS, pH 6,8, 40% Glicerol (Merck), 0,2 M DTT (Promega) e 0,04% de azul de bromofenol (Sigma)) em gelo. Este processo permite a desnaturação e linearização das proteínas. As amostras foram aquecidas a 95°C, durante 5 minutos, e arrefecidas em gelo durante outros 5 minutos. Após a polimerização do gel de concentração foi removido, cuidadosamente, o pente de modo a deixar os poços do gel intactos. O sistema com o gel de poliácridamida foi colocado numa tina de electroforese vertical contendo tampão de corrida (50 ml de stock de tampão de corrida 10X (0,25 M Tris-base (Sigma) e 1,92 M Glicina (Sigma)) e 5 ml de 10% SDS para 500 ml de volume total). Todo o volume das amostras desnaturadas foi aplicado ao poço correspondente dos géis, deixando o primeiro poço do gel para a aplicação de 3 µl de marcador de peso molecular *PageRuler™ plus* (Thermo Fisher Scientific Inc). Por fim, aplicou-se ao gel uma corrente de 140 V, durante aproximadamente uma hora, controlando a migração das proteínas através da visualização da migração do marcador de pesos moleculares.

### *Transferência de proteínas do gel para a membrana*

Para a transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose, começou por se recortar a membrana de nitrocelulose *Hybond-C* (GE Healthcare) e esta foi colocada em água durante 5 minutos para hidratar. Durante este tempo de incubação, procedeu-se à remoção do gel do molde, descartando a parte do gel de acumulação, para uma tina com água. Preparou-se, na hora, 1 litro de tampão de transferência, constituído por 250 ml de tampão de transferência 4X (95 mM Tris-base e 1,92 M glicina), 200 ml de metanol (Merck) e 550 ml de água. Num recipiente, contendo tampão de transferência, colocou-se a cassette de transferência a qual foi montada colocando uma esponja, seguida de papel de filtro, o gel, a membrana, um segundo papel de filtro e uma segunda esponja, com o cuidado de remover todas as bolhas de ar entre a adição de cada camada e mergulhar o sistema no tampão. Fechada a cassette, a mesma foi colocada no sistema de transferência, contendo tampão de transferência, evitando a formação de bolhas. A transferência do gel para a membrana foi efectuada a 0,2 A durante uma hora. Para confirmar a transferência, procedeu-se à coloração da membrana com *Ponceau* para visualizar as bandas proteicas na membrana. Para tal, lavou-se a membrana três vezes com água e incubou-se durante 3 minutos com solução de *Ponceau* 1X em água, preparada a partir da solução stock de *Ponceau* 10X (2% *Pouceau* (Merck), 30% ácido tricloroacético (Sigma) e 30% ácido sulfosalicílico (Sigma)). Confirmada a transferência, a membrana foi lavada com água para remover o excesso de *Ponceau*, seguido de três lavagens com 1X TBS (20 mM Tris-base (Sigma) e 150 mM NaCl (Merck), pH 7,6) com 0,1% Tween 20 (Sigma) até à remoção total do *Ponceau* da membrana. A membrana foi lavada com água e colocada a agitar durante 15 minutos em 15% de peróxido de hidrogénio (sigma). Após nova lavagem com água, a membrana foi deixada a incubar, no mínimo durante uma hora, com agitação, em 5% de leite em TBS 1X.

### *Incubações da membrana com anticorpos*

Nas incubações de *western blot*, foram testados os anticorpos primários pAkt, Akt 1/2 total, NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B- $\alpha$ , Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, XIAP, p53, p-Bad, pFOXO 3A, Mdm2 e  $\beta$ -actina. Para tal, a membrana foi removida do leite e lavada três vezes com água, três vezes com 1X TBS plus 0,1% Tween 20, durante 5 minutos, com agitação e, novamente, lavada três vezes com água. Por fim, a membrana foi deixada a incubar com o anticorpo primário (ressuspendido em 5% leite em TBS 1X), com agitação,

durante a noite. Antes da adição do anticorpo secundário, procedeu-se à remoção do anticorpo primário e à lavagem da membrana como descrito anteriormente. Foi adicionado, à membrana, o anticorpo secundário conjugado com IgG *anti-rabbit* ou *anti-mouse*, dependendo da proteína a detectar, conjugado com peroxidase de rábano, diluído em 5% leite em TBS 1X (Tabela XX). Após 2 a 3 horas, o anticorpo secundário foi removido e a membrana lavada novamente.

**Tabela XX – Propriedades e condições de revelação e detecção de cada anticorpo primário utilizado**

Anticorpo primário <sup>1</sup>	Peso Molecular	Origem	Anticorpo secundário <sup>2</sup>	Reagente de detecção <sup>3</sup>	Condições de revelação <sup>4</sup>	Condições de detecção <sup>5</sup>
Akt-p	55 kDa	Rabbit	Anti-Rabbit	Immobilon™	500 µl A + 500 µl T + 500 µl S	300 segundos
Akt1/2	60 kDa	Rabbit	Anti-Rabbit	Immobilon™	500 µl A + 500 µl T + 500 µl S	300 segundos
β-Actina	43 kDa	Mouse	Anti-Mouse	Immobilon™	1000 µl A + 500 µl T + 500 µl S	60 segundos
Bcl-2	28 kDa	Mouse	Anti-Mouse	SuperSignal™ West Femto	300 µl A + 300 µl T + 300 µl S	300 segundos
Bcl-XL	32 kDa	Rabbit	Anti-Rabbit	SuperSignal™ West Femto	300 µl T + 300 µl S	300 segundos
Ikb-α	37 kDa	Rabbit	Anti-Rabbit	Immobilon™	500 µl A + 500 µl T + 500 µl S	60 segundos
Mdm2	90 kDa	Mouse	Anti-Mouse	SuperSignal™ West Femto	300 µl A + 300 µl T + 300 µl S	300 segundos
NF-κB	65kDa	Rabbit	Anti-Rabbit	Immobilon™	500 µl A + 500 µl T + 500 µl S	60 segundos
p-Bad	27 kDa	Rabbit	Anti-Rabbit	Não se conseguiu detectar		
p53	53 kDa	Mouse	Anti-Mouse	Immobilon™	1000 µl A + 500 µl T + 500 µl S	300 segundos
pFOXO3A	95 kDa	Rabbit	Anti-Rabbit	Não se conseguiu detectar		
XIAP	55 kDa	Rabbit	Anti-Rabbit	Immobilon™	1000 µl A + 200 µl T + 200 µl S	60 segundos

<sup>1</sup>phospho-Akt1, total Akt1/2 (H-136), Bcl-2 (C-2), Bcl-XL (L-19), Ikb-α (C-21), Mdm2 (SMP-14), NF-κB (C-20), pBad (Ser136), p53 (Pab-240), and XIAP (H-202), Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, EUA; pFOXO3A (Thr32), Chemicon Int., Temecula, California, EUA; β-actin (A5441), Sigma-Aldrich Corp.

<sup>2</sup>IgG anti-mouse/anti-rabbit conjugada com peroxidase (Bio-Rad)

<sup>3</sup>Immobilon (Merck Millipore Corp.); SuperSignal™ West Femto (Thermo Fisher Scientific Inc.)

<sup>4</sup>A - Água, T - Tampão, S - Substrato

<sup>5</sup>Tempo de exposição no sistema de detecção Chemidoc

### Revelação e detecção das proteínas

Após incubação da membrana com o anticorpo primário e secundário, foram utilizados dois tipos de substrato luminescente para a revelação das proteínas, *Immobilon™* e *Supersignal™ West Femto*. As condições e tipo de substrato adicionado às membranas encontra-se resumido na Tabela XX. Este substrato foi adicionado às membranas durante 1 minuto, após o qual a membrana foi cuidadosamente colocada num envelope de plástico de modo a evitar a formação de bolhas e impedir a desidratação da membrana. Por fim, a detecção das proteínas foi efectuada através da captura da luminescência emitida, lida no transiluminador equipado com captura de luminescência *Bio-Rad Chemidoc* (Bio-Rad) com tempos de exposição variáveis, dependentes da proteína a detectar (Tabela XX). As intensidades relativas das bandas de proteína detectadas por *western blot* foram analisados por densitometria utilizando o software informático *Quantity One* (Bio-Rad).

#### *Remoção dos anticorpos das membranas*

Para se poder revelar mais que uma proteína em cada membrana, foi necessário recorrer à remoção dos anticorpos (primário e secundário) agregados às membranas, antes de novas incubações. Para tal, foram utilizadas duas soluções de extracção que, devido à sua acidez, fazem com que os anticorpos se desagreguem da membrana. Após a revelação as membranas foram lavadas três vezes com água, incubadas com solução de extracção 1 (0,2 M glicina e 0,5 M NaCl, ajustada a um pH de 2,8 com ácido acético glacial), durante 10 minutos com agitação, à temperatura ambiente, lavadas três vezes com água, incubadas com solução de extracção 2 (0,5 M ácido acético glacial (Merck) e 0,5 M NaCl, pH 2,5), durante 10 minutos com agitação e lavadas novamente três vezes com água. No final, as membranas a serem utilizadas para novas incubações com anticorpos foram deixadas em 5% de leite em 1X TBS (no mínimo 30 minutos) até nova incubação.

#### 5.2.3.4 Actividade do NF- $\kappa$ B

A detecção da actividade do NF- $\kappa$ B foi efectuada nos extractos celulares totais das amostras das 8 e 16hpi. E detectada através da utilização do kit comercial *TransAM<sup>TM</sup> NF- $\kappa$ B p65* (Active Motif®, Carlsbad, Califórnia, EUA). Este kit comercial contém uma placa de 96 poços com um revestimento que apresenta o oligonucleótido consensos do local de ligação do NF- $\kappa$ B. Assim, quando o NF- $\kappa$ B presente nos extractos celulares está activo, vai-se ligar especificamente à placa. Um anticorpo dirigido à subunidade p65 do NF- $\kappa$ B e um anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rábano permitirá a detecção do NF- $\kappa$ B activo por espectrofotometria. A cada poço da placa, foram adicionados 30  $\mu$ l de tampão de ligação e 20  $\mu$ l da respectiva amostra, previamente diluída (40  $\mu$ g de proteína) em tampão de lise. A placa foi selada e colocada a incubar durante 1 hora com agitação de 100 rpm para a ligação do NF- $\kappa$ B activo nos extractos celulares ao oligonucleótido presente na placa. Cada poço foi lavado três vezes com 200  $\mu$ l de solução de lavagem e adicionou-se 100  $\mu$ l/poço do anticorpo anti-p65 NF- $\kappa$ B diluído 1:1000 em tampão de ligação, e a placa foi selada e deixada a incubar à temperatura ambiente durante uma hora. Cada poço foi novamente lavado três vezes com 200  $\mu$ l de solução de lavagem e adicionou-se 100  $\mu$ l/poço do anticorpo secundário conjugado com peroxidase de rabano, diluído 1:1000 em tampão de ligação, a placa foi selada e deixada a incubar à temperatura ambiente durante uma hora. No final da incubação com o anticorpo secundário, cada poço foi lavado quatro vezes com solução de lavagem, adicionados 100  $\mu$ l/poço de solução de

revelação e após 2 minutos de incubação foram adicionados 100 µl de solução stop e a absorvância de cada poço foi lida num espectrofotómetro de placas (Bio-Rad) no comprimento de onda 450 nm.

#### **5.2.4 Análise das proteínas virais na indução da apoptose**

Verificadas diferenças na indução da apoptose na infecção pelo vírus A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006, começou por se avaliar se a base destas diferenças tinha como factor principal a presença da proteína viral NS1, sendo esta a mais descrita como estando envolvida nos mecanismos de apoptose inibidos pelos vírus influenza do tipo A.

##### 5.2.4.1 Translocação do NF-κB em células transfectadas com o gene NS1

Das vias celulares analisadas neste trabalho a via do NF-κB foi a que apresentou diferenças maiores, entre ambos os vírus estudados, o que pode justificar as diferenças observadas nos perfis cinéticos de apoptose de cada vírus. Assim, começou-se por analisar o efeito da proteína viral NS1 na activação da via do NF-κB. Células MDCK-SIAT 1 foram transfectadas com os plasmídeos contendo, ou o segmento genético que codifica a proteína NS1 do vírus influenza do tipo A (NS1A), ou segmento genético que codifica a proteína NS1 do vírus influenza do tipo B (NS1B). Nestas células, foi analisada, por imunocitoquímica, a translocação do NF-κB do citoplasma para o núcleo.

##### *Aferição da transfecção*

Para a transfecção das células MDCK-SIAT1, foi necessário, como aconselhado pelo fabricante, aferir as quantidades de *Lipofectamine*® 2000 e de DNA plasmídico a usar de modo a ter um máximo de eficiência possível na transfecção destas células em placas de Petri de 35 mm. Para esta aferição, foi utilizado o plasmídeo de expressão *pCIPollSapIT\_GFP*. Este plasmídeo, quando presente na célula vai transcrever uma proteína inócua à célula, verde fluorescente, que torna a célula transfectada verde quando visualizada em microscopia de fluorescência.

Foram aferidos três volumes diferentes de *Lipofectamine*® 2000 (6, 9 e 12 µl/placa) e quatro quantidades diferentes de DNA plasmídico (1,5, 2,5, 3,5 e 4,5 µg/placa).

Num tubo por condição, foram adicionados os diversos volumes de *Lipofectamine*® 2000 a aferir a 150 µl de OPTI-MEM. Igualmente, em tubos separados, foram adicionados as diferentes quantidades de DNA plasmídico a aferir a 150 µl de OPTI-MEM. Todos os tubos descritos anteriormente foram



deixados à temperatura ambiente durante 20 minutos. Após este tempo de incubação, aos respectivos tubos com 150 µl da diluição de *Lipofectamine*® 2000 foram adicionados 150 µl das quantidades de DNA plasmídico correspondentes. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 5 minutos para ocorrer a ligação dos plasmídeos à *Lipofectamine*® 2000. Durante este período de incubação, às placas de Petri de 3,3 cm<sup>2</sup> com uma monocamada de células MDCK-SIAT1 de cerca de 90%, a usar na transfecção, foi removido o meio de crescimento, foram lavadas com 1 ml de meio suplementado, pré-aquecido a 37°C e adicionados 1 ml de meio de transfecção (OPTIMEM). Após os 5 minutos de incubação, foram adicionados gota a gota, às respectivas placas de Petri, 300 µl da mistura DNA + *Lipofectamine*® 2000 e as placas foram colocadas a incubar a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Vinte e quatro horas após a transfecção, foi removido o meio de transfecção, as células foram lavadas com 1 ml de DPBS, fixas com 1 ml de paraformaldeído a 4% em DPBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após três lavagens com DPBS as células foram coradas com 1 ml de Hoechst 33258 a 5 µg/ml para corar todos os núcleos celulares, lavadas três vezes com DPBS e foi utilizado glicerol em DPBS (1:3, v/v) como meio de montagem. Cada condição foi observada por microscopia de fluorescência onde foram capturados quatro campos de cada condição com o filtro de comprimento de onda verde (células transfectadas) e UV (núcleos das células). Nas imagens capturadas foi contabilizado o número de células transfectadas (a verde) e o número total de células (número de núcleos corados a azul).

#### *Transfecção das células MDCK-SIAT1 com o gene NS1*

Como controlo de transfecção, nesta parte do trabalho foi utilizado, juntamente com o gene em estudo, o plasmídeo de transcrição da proteína GFP, *pCIPollSapIT\_GFP*.

Placas de Petri de 3,3 cm<sup>2</sup> com uma monocamada de células MDCK-SIAT1 de cerca de 90% foram co-transfectadas com *pCIPollSapIT\_NS1\_A* + *pCIPollSapIT\_GFP*; *pCIPollSapIT\_NS1\_B* + *pCIPollSapIT\_GFP* e *pCIPollSapIT\_GFP* + *pCIPollSapIT* (controlo) nas condições previamente aferidas. Num tubo por condição, foram adicionados 9 µl de *Lipofectamine*® 2000 a 150 µl de OPTI-MEM. Igualmente, em tubos separados, foram adicionados 3,5 µg de *pCIPollSapIT\_NS1\_A*, *pCIPollSapIT\_NS1\_B* ou *pCIPollSapIT* e 3,5 µg de *pCIPollSapIT\_GFP* a 150 µl de OPTI-MEM. Todos os tubos descritos anteriormente foram deixados à temperatura ambiente durante 20 minutos. Após este tempo de incubação, aos respectivos tubos, com 150 µl da diluição de *Lipofectamine*®

2000, foram adicionados 150 µl da diluição dos plasmídeos correspondentes. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 5 minutos para ocorrer a ligação dos plasmídeos à *Lipofectamine® 2000*. Durante este período de incubação, às placas de Petri com as células a usar na transfecção foi removido o meio de crescimento, lavadas com 1 ml de meio suplementado, pré-aquecido a 37°C, e adicionados 1 ml de meio de transfecção. Após os 5 minutos de incubação, foram adicionados gota a gota, às respectivas placas de Petri, 300 µl da mistura DNA + *Lipofectamine® 2000* e as placas foram colocadas a incubar a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h.

#### *Imunocitoquímica das células transfectadas*

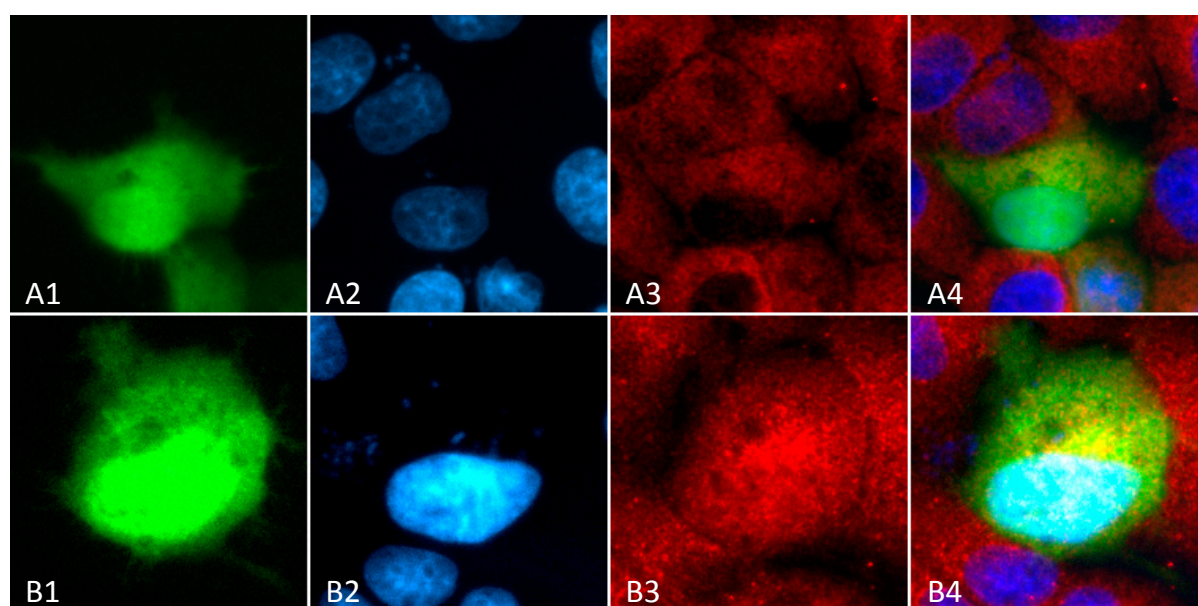
A activação do NF-κB nas células transfectadas foi analisada recorrendo à técnica de imunocitoquímica para detectar o NF-κB no citoplasma e no núcleo celular, pois o NF-κB activo migra para o núcleo celular para activar a transcrição dos seus genes alvo. Após 24 h da transfecção, às placas de Petri com as células MDCK-SIAT1 transfectadas foi removido o meio de transfecção e, com cuidado, procedeu-se à sua lavagem com 1 ml de DPBS, pré-aquecido a 37°C. Para a fixação e permeabilização das células foi adicionado 1 ml de paraformaldeído a 4% em DPBS, pH 7,4 durante 30 minutos à temperatura ambiente, o qual foi removido, após o período de incubação. O excesso foi lavado com 1 ml de DPBS. As células foram incubadas com 60 µl de solução de bloqueio (10% de soro de burro (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pennsylvania, EUA), 1% de FBS e 0,1% de Triton-X-100 em PBS) durante 1 hora à temperatura ambiente. As células e a solução de bloqueio foram cobertas com uma lamela de plástico de modo a espalhar a solução uniformemente por todas as células. As células foram deixadas a incubar durante a noite a 4°C com 60 µl de anticorpo primário de ratinho anti-NF-κB p65 (F-6, Santa Cruz Biotechnology Inc.) diluído em solução de bloqueio (1:100). O excesso de anticorpo primário foi removido e as células foram lavadas três vezes com 1 ml de PBS, durante 10 minutos, com agitação. As células foram incubadas com 60 µl de anticorpo secundário conjugado IgG anti-mouse Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Life Technologies) (vermelho) diluído em solução bloqueio (1:200) durante 1 hora à temperatura ambiente, protegidas da luz. A preparação foi coberta com uma lamela de plástico para garantir a distribuição uniforme do anticorpo secundário por todas as células. Por fim, as células foram novamente lavadas três vezes com 1 ml de PBS, durante 10 minutos, com agitação.

### Coloração dos núcleos

Para a coloração dos núcleos das células transfectadas presentes nas placas de Petri, recorreu-se ao mesmo fluorocromo utilizado anteriormente, específico da cromatina, Hoechst 33258, que cora apenas os núcleos das células. Assim, após a lavagem do anticorpo secundário, as células foram incubadas com 1 ml do fluorocromo Hoechst a 5 µg/ml em PBS durante 5 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Por fim, as placas foram novamente lavadas três vezes com PBS para remover o excesso de corante e foram utilizados 15 µl de *Fluoromont*<sup>TM</sup> como meio de montagem.

### Visualização e captação das imagens das células transfectadas

As preparações celulares foram observadas por microscopia de fluorescência, onde foram visualizados e captados, para posterior processamento, quatro campos com células transfectadas (verde). Para cada campo foi efectuada a captura da imagem com o filtro de comprimento de onda verde (células transfectadas), filtro UV (núcleos das células) e filtro vermelho (NF-κB) (Figura 26).



**Figura 26** – Exemplo de uma célula transfectada com o *pCIPol/SapIT\_GFP + pCIPol/Sat\_NS1B* sem (A) e com (B) translocação de NF-κB do citoplasma para o núcleo. **1** – GFP, controlo de célula transfectada. **2** – Coloração de Hoescht apresenta todos os núcleos celulares. **3** – Imunocitoquímica indirecta com o anticorpo primário anti-NF-κB (mouse) e anticorpo secundário red-anti-mouse. **4** – imagem combinada dos três filtros

### *Processamento das imagens captadas*

O processamento das imagens de microscopia de fluorescência foi efectuado com o programa informático *ImageJ v1.47* (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA). As imagens captadas com o filtro verde (células transfectadas) foram utilizadas para seleccionar e criar um *layer* do contorno do citoplasma de cada célula transfectada. Nas imagens captadas com o filtro UV (núcleos), foi seleccionado e criado um *layer* de cada contorno do núcleo da respectiva célula transfectada. Por fim, a imagem captada com o filtro vermelho (NF-κB) foi utilizada para determinar a densidade de pigmentação por unidade de área de cada citoplasma (subtracção da área do *layer* do núcleo à área do *layer* do citoplasma) e da área de cada núcleo (área do *layer* do núcleo) de cada célula transfectada. Definiu-se que ocorreu activação do NF-κB sempre que a densidade de pigmentação do núcleo foi igual ou superior à do citoplasma.

#### 5.2.4.2 Efeito de cada gene viral na indução da apoptose

Devido à baixa taxa de transfecção das células MDCK-SIAT1 (aproximadamente 15%), o estudo do efeito que cada segmento genético viral tem na inibição/indução da apoptose das células transfectadas foi realizado recorrendo ao teste da medição da actividade das caspases 3/7 por luminescência (caspase-glo<sup>®</sup>), por se tratar de um método sensível, que permite detectar pequenas variações na actividade das caspases 3/7, caspases efectoras que, quando activas, indicam que a célula está em processo apoptótico. Foi testado o efeito da transfecção de plasmídeos bidireccionais contendo os diversos genes do vírus A/Portugal/82/2009, B/Lisboa/08/2006 e utilizando como controlo o plasmídeo que codifica a proteína GFP às 8, 16 e 24 horas pós transfecção (hpt) (Tabela XXI). A construção dos plasmídeos encontra-se descrita no ponto 4.5.

**Tabela XXI** – Resumo dos plasmídeos utilizados na transfecção das células para o estudo da inibição/indução da actividade das caspases 3/7

Segmento genético	A/Portugal/82/2009	B/Lisboa/08/2006
PB2	pCIPollSapIT_PB2_A	pCIPollSapIT_PB2_B
PB1	pCIPollSapIT_PB1_A	pCIPollSapIT_PB1_B
PA	pCIPollSapIT_PA_A	pCIPollSapIT_PA_B
HA	pCIPollSapIT_HA_A	pCIPollSapIT_HA_B
NP	pCIPollSapIT_NP_A	pCIPollSapIT_NP_B
NA	pCIPollSapIT_NA_A	pCIPollSapIT_NA_B
M	pCIPollSapIT_M_A	pCIPollSapIT_M_B
NS	pCIPollSapIT_NS1_A	pCIPollSapIT_NS1_B
GFP	pCIPollSapIT_GFP	

Para este ensaio foram utilizadas células MDCK-SIAT1 semeadas em placas brancas de fundo transparente com tratamento celular *Krystal*® 2000 (Porvair Sciences, Wrexham, País de Gales, Reino Unido). Estas placas têm a particularidade de apresentarem um fundo isolado por poço, que impede a contaminação da luminescência pela luminescência dos poços vizinhos. As condições de transfecção utilizadas foram as aferidas no ponto 5.2.4.1 adaptadas às placas de 96 poços.

Células MDCK-SIAT1 foram semeadas em placas brancas de fundo transparente *Krystal*® 2000 (em triplicado, uma placa por cada tempo pós-transfecção) 48 horas antes da transfecção de modo a que cada poço contivesse cerca de  $4 \times 10^4$  células por poço no momento da transfecção. Num tubo foi preparada a mistura de OPTI-MEM correspondente a 54 poços (8 poços para os plasmídeos com segmentos genéticos da estirpe A/Portugal/82/2009 + 8 poços para os plasmídeos com segmentos genéticos da estirpe B/Lisboa/08/2006 + 1 poço para o gene controlo + 1 poço extra, em triplicado – 3 tempos pós-transfecção), ou seja, foram adicionados 18,9 µl de *Lipofectamine*® 2000 a 270 µl de OPTI-MEM (0,35 µl de *Lipofectamine*® 2000 a 5 µl de OPTI-MEM por poço). Separadamente, num tubo por gene, foram adicionados 450 ng de DNA plasmídico a 15 µl de OPTI-MEM (150 ng de DNA plasmídico a 5 µl de OPTI-MEM por poço). Ambas as misturas foram mantidas à temperatura ambiente durante 20 minutos, após os quais, a cada tubo de DNA plasmídico diluído em OPTI-MEM foram adicionados 15 µl da mistura de *Lipofectamine*® 2000 diluída e mantidos à temperatura ambiente, durante 5 minutos, para ocorrer a ligação do DNA plasmídico ao complexo lipídico. Durante estes 5 minutos, foi removido o sobrenadante às células das três placas, as células foram lavadas uma vez com meio suplementado a 37°C e a cada poço foram adicionados 90 µl de meio de transfecção. Passados os 5 minutos de incubação, 10 µl de cada complexo lipídico ligado ao DNA plasmídico foi adicionado ao poço correspondente a cada placa de 96 poços (Figura 27). As placas foram colocadas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> e nesse momento foi determinado o tempo zero horas pós-transfecção (hpt).

Em cada tempo pós-transfecção (8, 16 e 24 hpt) foi retirada da estufa a 37°C uma placa de 96 poços com as células transfectadas e medida a actividade das caspases 3/7 utilizando o sistema Caspase-Glo® 3/7, como descrito anteriormente. Ou seja, a cada poço foram adicionados 100 µl do reagente Caspase-Glo® 3/7, razão 1:1 (v/v) aos 100 µl do meio de transfecção presentes no poço. A placa de 96 poços foi colocada num agitador de placas a 500 rpm durante 30 segundos e foi deixada a

incubar durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação a luminescência foi medida no leitor de placas FLUOstar OPTIMA equipado com opção de leitura de luminescência.

		A	B	C	D	E	F	G	H
	1								
pCIPollSapIT_PB2	2								
pCIPollSapIT_PB1	3								
pCIPollSapIT_PA	4								
pCIPollSapIT_HA	5								
pCIPollSapIT_NP	6								
pCIPollSapIT_NA	7								
pCIPollSapIT_M	8								
pCIPollSapIT_NS1	9								
pCIPollSapIT_GFP	10								
	11								
	12								

**Figura 27** – Representação esquemática da placa de 96 poços utilizada no ensaio de transfecção para a medição da actividade das caspases 3/7, onde são indicados a distribuição dos genes transfectados de cada vírus e do plasmídeo controlo (*pCIPollSapIT\_GFP*)

### 5.2.5 Tratamento de resultados e análise estatística

Todos os ensaios efectuados e descritos desde o ponto 5.2.1 ao ponto 5.2.4, inclusivé, foram realizados, de forma isolada, em quadruplicado, de modo a conseguir resultados com significância estatística. Devido à variabilidade dos resultados provenientes de sistemas biológicos variáveis, como é o caso de células em cultura, todos os resultados, com excepção dos resultados obtidos no ponto 5.2.2.2 e 5.2.4.1, foram uniformizados com o respectivo controlo, descrito e utilizado em cada tempo pós-infecção/pós-transfecção de cada ensaio e representados em *fold change*. Os resultados foram processados, analisados e representados em forma de média dos ensaios  $\pm$  desvio padrão da média (DPM).

A análise estatística foi efectuada recorrendo ao programa informático de análise estatística *IBM® SPSS® Statistics V22.0.0.0* (IBM, Armonk, Nova Iorque, EUA). Os valores representados em *fold change* foram sujeitos a dois tipos de análise: na primeira foram comparados os valores entre o vírus A/Portugal/82/2009 e o vírus B/Lisboa/08/2006 utilizando a análise *t-student* de amostras independentes, para detectar as diferenças estatisticamente significantes entre os valores obtidos entre os dois tipos de vírus; na segunda análise foram comparados os valores do vírus

A/Portugal/82/2009 e do vírus B/Lisboa/08/2006 com o valor do controlo (valor constante = 1) utilizando a análise *t-student* de uma amostra, de modo a detectar diferenças estatisticamente significantes entre os vírus em estudo e o controlo utilizado. Nos restantes resultados, para detectar diferenças estatisticamente significativas entre os vários grupos, foi feita a análise ANOVA unidireccional seguida da análise pelo teste de comparações múltiplas com o *post hoc* de Tukey. Todos os valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos.

### **5.3 Resultados**

#### **5.3.1 Perfil cinético de indução da apoptose na infecção com vírus influenza do tipo A e do tipo B**

##### 5.3.1.1 Morte celular total

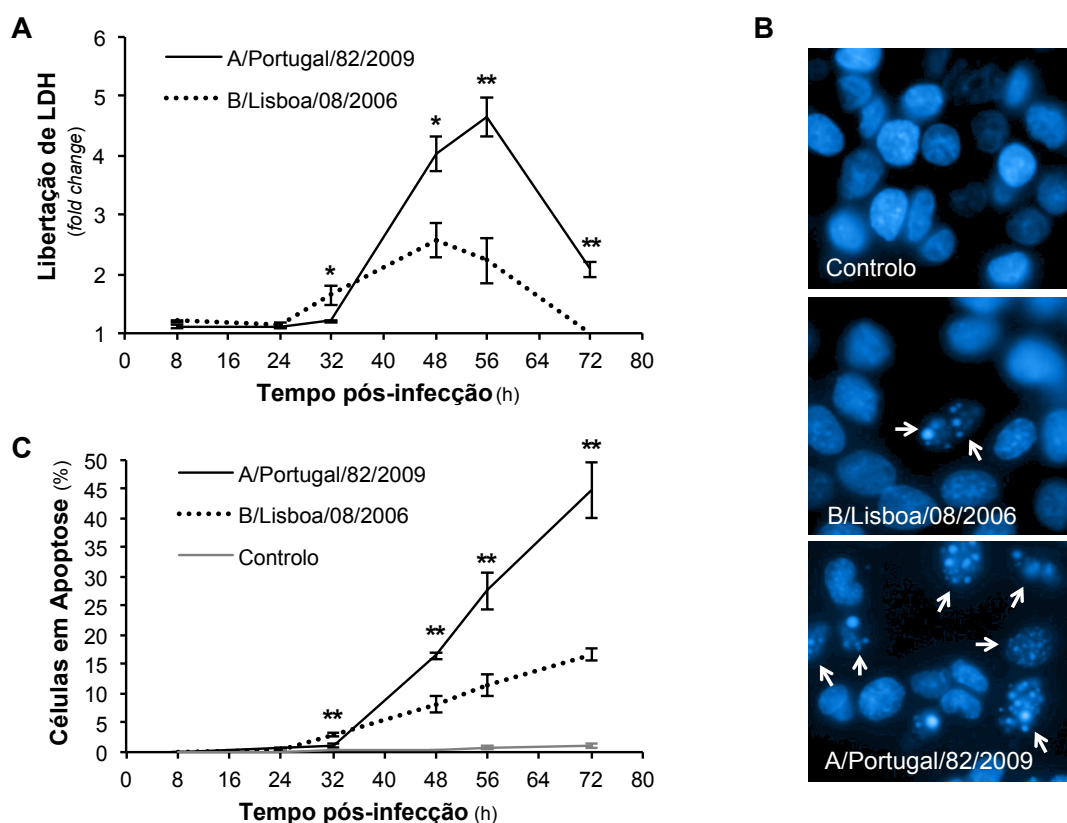
As diferenças entre a infecção por vírus influenza do tipo A e do tipo B têm merecido a atenção da comunidade científica, nomeadamente diferenças na epidemiologia e severidade da doença, infecciosidade e ciclo replicativo [123]. Para tentar compreender algumas destas diferenças a citotoxicidade da infecção por vírus influenza do tipo A e do tipo B foi avaliada e comparada. Inicialmente, a morte celular total foi avaliada, durante 72 horas, através de medições da actividade da enzima LDH no sobrenadante de culturas celulares infectadas com vírus influenza do tipo A, do tipo B e controlo (meio suplementado). A indução da morte celular total na infecção com o vírus A/Portugal/82/2009 e com o vírus B/Lisboa/08/2006 difere no tempo e intensidade. A indução da morte celular na infecção com o vírus B/Lisboa/08/2006 ocorre a partir das 24 hpi e na infecção com o vírus A/Portugal/82/2009 ocorre mais tarde, após as 32 hpi ( $p < 0,01$ ) (Figura 28A).

Em relação à intensidade da morte celular provocada pela infecção, o vírus A/Portugal/82/2009 mostrou ser mais letal para as células, atingindo um máximo de libertação de LDH às 56 hpi, cerca de 6 vezes superior ao valor do controlo negativo ( $p < 0,01$ ), enquanto que na infecção com o vírus B/Lisboa/08/2006, este máximo foi cerca de 2 vezes superior ao valor do controlo negativo, às 48 hpi, revelando-se menos tóxica para as células ( $p < 0,05$ ).

##### 5.3.1.2 Morfologia de células em apoptose

A capacidade dos vírus A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006 induzirem a apoptose nas células infectadas foi inicialmente avaliada por observação morfológica dos núcleos de células MDCK-SIAT1,

coradas com o corante Hoechst, durante 72 horas após a infecção (Figura 28B e C). Os núcleos das células em apoptose são morfologicamente característicos por apresentarem a cromatina condensada contígua à membrana nuclear assim como fragmentação nuclear (indicados com setas na Figura 28B). A análise morfológica das células infectadas com o vírus A/Portugal/82/2009 revela um aumento das células em apoptose, a partir das 32 hpi até às 72 hpi, com um máximo de 45% de células em apoptose. Por sua vez, a infecção com o vírus B/Lisboa/08/2006 induziu a apoptose nas células infectadas, a partir das 24 hpi, com um máximo de aproximadamente 20% de células em apoptose (Figura 28C).



**Figura 28** – A infecção com os vírus A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006 induz diferentes perfis de morte celular e apoptose. A análise da morte celular total e a análise morfológica da apoptose foram avaliadas em células MDCK-SIAT1 infectadas com os vírus A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006 durante 72 horas. **A** – Monitorização da libertação de LDH nas células infectadas durante 72 hpi mostrou que a infecção com o vírus A/Portugal/82/2009 induz a libertação de níveis de LDH superiores aos da infecção com o vírus B/Lisboa/08/2006. **B** – Microscopia de fluorescência das células controlo, das células infectadas com o vírus B/Lisboa/08/2006 e das células infectadas com o vírus A/Portugal/82/2009, 72 hpi após coloração de Hoechst. As células morfológicamente em apoptose estão indicadas com setas. **C** – A percentagem de células em apoptose na infecção com o vírus A/Portugal/82/2009, apesar de mais tardia, apresenta valores mais altos do que os valores obtidos na infecção com o vírus B/Lisboa/08/2006. Os valores apresentados nos gráficos referem-se ao valor médio  $\pm$  DPM de pelo menos três ensaios independentes. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  comparativamente a B/Lisboa/08/2006. Adaptado de Santos *et al.*, 2015 [124].



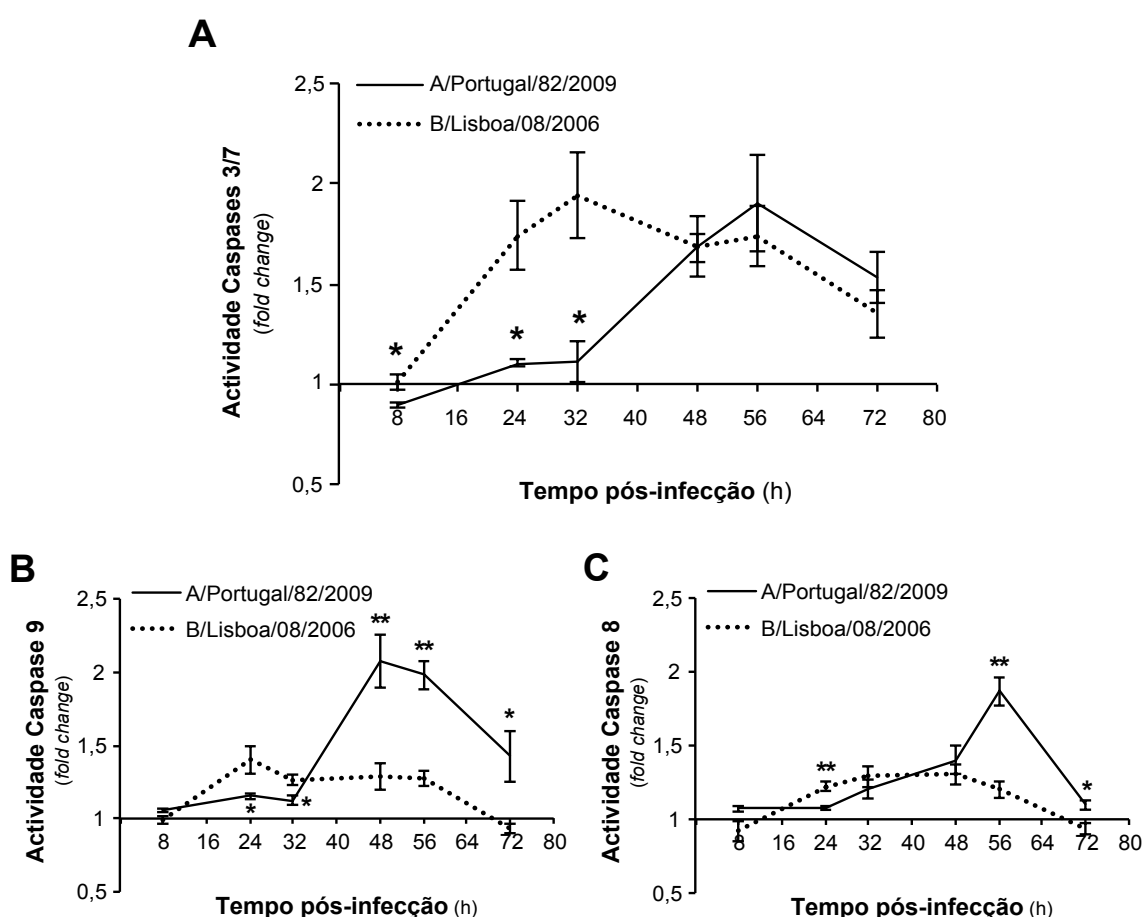
Estes resultados sugerem que a indução da apoptose e o aumento da morte celular total ocorrem mais cedo, mas com uma intensidade menor, nas células infectadas com o vírus B/Lisboa/08/2006 comparativamente com a infecção com o vírus A/Portugal/82/2009. Verifica-se ainda que o perfil de morte celular total é semelhante ao perfil de apoptose para ambos os vírus.

#### 5.3.1.3 Actividade das caspases

Para avaliar as potenciais diferenças na indução da apoptose e mecanismos associados como consequência da infecção com os vírus A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006, recorreu-se à medição da actividade das caspases efectoras 3/7 e das caspases iniciadoras (caspase 9, associada à via intrínseca, e a caspase 8, associada à via extrínseca). Os resultados da actividade das caspases efectoras 3/7, indicam que a infecção com o vírus A/Portugal/82/2009 induz a apoptose maioritariamente entre as 32 e as 56 hpi, ponto de leitura onde foi registado um valor máximo 1,9 vezes superior ao valor obtido para o controlo negativo ( $p < 0,01$ ) (Figura 29A). Na infecção com o vírus B/Lisboa/08/2006 o valor da actividade das caspases efectoras aumentou logo desde as 8 hpi, mantendo-se superior aos valores registados para o vírus A/Portugal/82/2009 até às 48 hpi ( $p < 0,05$ ). Esta diferença na indução da actividade das caspases efectoras pela infecção com o vírus A/Portugal/82/2009 e pela infecção com o vírus B/Lisboa/08/2006, corrobora a diferença anteriormente observada nos perfis obtidos na análise morfológica das células em apoptose.

Na actividade das caspases iniciadoras, caspase 9 e 8, também foram observadas diferenças entre a infecção com o vírus A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006 (Figura 29B e C). A actividade da caspase associada à via intrínseca, caspase 9, na infecção com o vírus A/Portugal/82/2009 registou valores superiores aos obtidos para as células controlo durante as primeiras 32 hpi ( $p < 0,05$ ). A partir deste momento e até às 48 hpi, a actividade da caspase 9 aumentou e atingiu o valor máximo de duas vezes superiores à actividade das células controlo ( $p < 0,05$ ). Na infecção com o vírus B/Lisboa/08/2006, actividade da caspase 9 aumentou durante as primeiras 24 hpi (momento em que foi registado o valor máximo) persistindo até às 56 hpi, no entanto com valores inferiores aos registados na infecção com o vírus A/Portugal/82/2009. O aumento da actividade da caspase 8, associada à via dos receptores de morte foi detectado logo desde as 8 hpi na infecção com o vírus B/Lisboa/08/2006, enquanto que na infecção com o vírus A/Portugal/82/2009, este aumento foi detectado mais tarde, atingido o pico máximo numa fase tardia da infecção (56 hpi).

Estes resultados apontam para existência de diferentes perfis de indução da apoptose nas células infectadas com o vírus A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006. O vírus B/Lisboa/08/2006 provoca uma resposta imediata de indução da apoptose nas células infectadas, no entanto com níveis de morte celular total e de apoptose mais baixos que os registados na infecção com o vírus A/Portugal/82/2009, para o qual estes valores são registados num momento mais tardio da infecção. A actividade das caspases iniciadoras mostra, ainda, que na infecção com o vírus B/Lisboa/08/2006, a indução da apoptose ocorre por ambas as vias, intrínseca e extrínseca, enquanto que na infecção com o vírus A/Portugal/82/2009, esta indução ocorre maioritariamente pela via intrínseca, registando-se também a activação da via extrínseca, mas numa fase mais tardia da infecção.



**Figura 29** – A infecção de células MDCK-SIAT1 com os vírus A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006 induz diferentes perfis de actividade das caspases. A análise da actividade das caspases foi avaliada em células MDCK-SIAT1 infectadas com as estirpes A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006 durante 72 horas, como descrito nas metodologias aplicadas. **A** – Actividade das caspases efectoras 3/7. **B** – Actividade da caspase iniciadora 9, caspase associada à via intrínseca de apoptose. **C** – Actividade da caspase iniciadora 8, caspase associada à via extrínseca de apoptose. Os valores apresentados nos gráficos referem-se ao valor médio  $\pm$  DPM de pelo menos três ensaios independentes. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  comparativamente a B/Lisboa/08/2006. Adaptado de Santos *et al.*, 2015 [124].

### 5.3.2 Vias celulares afectadas pela infecção por vírus influenza

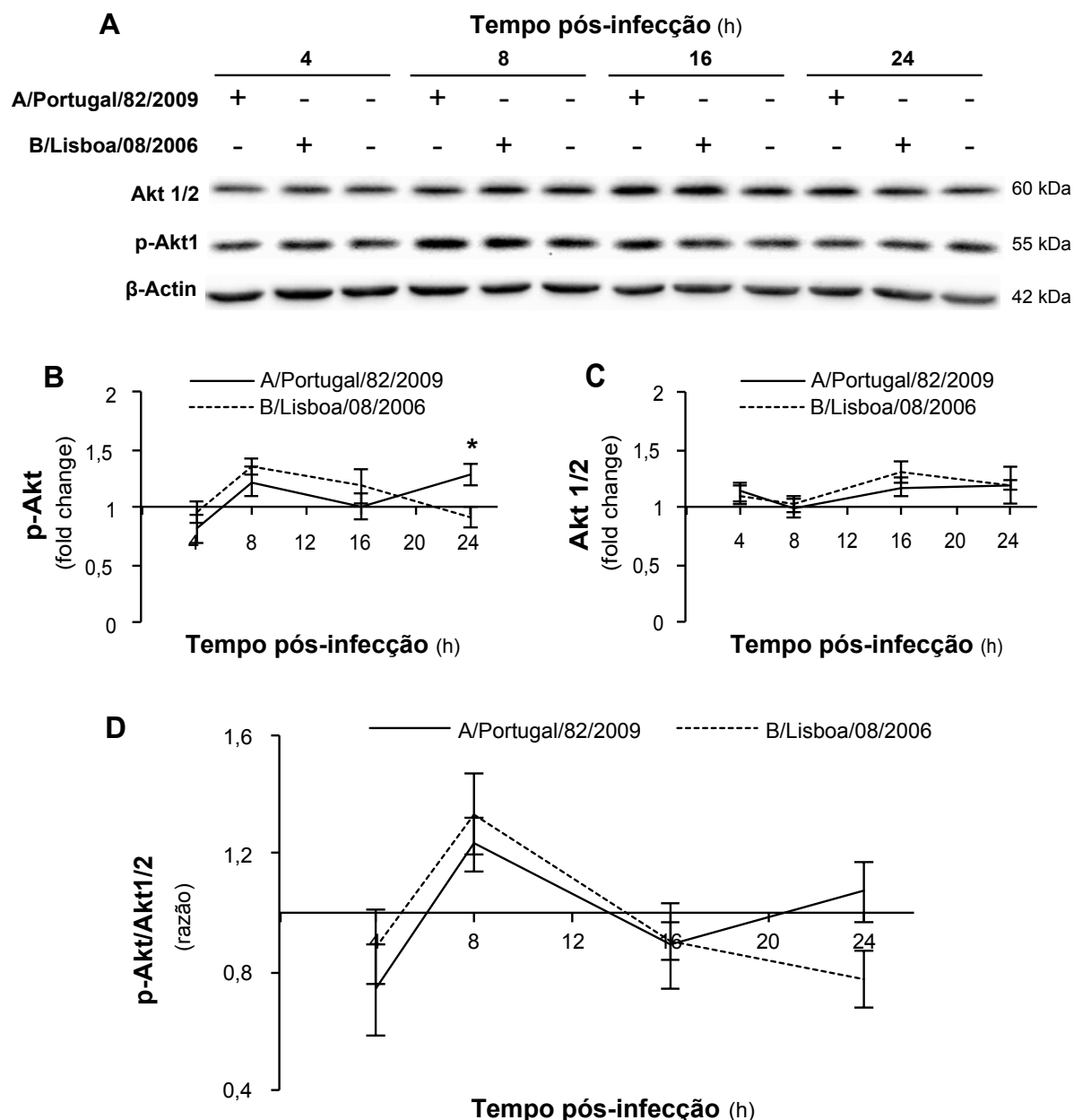
#### 5.3.2.1 Via do PI3K/Akt

A activação da via do PI3K/Akt conduz, na maioria das linhas celulares, à sobrevivência celular e inibição da apoptose. A via de sobrevivência do Akt está também descrita como uma via que cria um ambiente favorável para a replicação e montagem da progénie viral [71]. Assim, o estudo desta via de sobrevivência é essencial para perceber se o desfasamento observado entre os perfis de indução da apoptose pela infecção pelos vírus em estudo se deve à activação da via do PI3K/Akt.

Lisados de células infectadas com o vírus A/Portugal/82/2009, com o vírus B/Lisboa/08/2006 e de células não infectadas foram sujeitos a análise por *western blot* com o anticorpo para a forma activa do Akt (anti-phospho-Akt1; p-Akt1) (Figura 30A e B). As membranas foram ainda incubadas com o anticorpo Akt1/2 (níveis totais de Akt – Figura 30A e C). O cálculo da razão p-Akt1/Akt1/2 indica que ambas as infecções, com o vírus A/Portugal/82/2009 e com o vírus B/Lisboa/08/2006, induzem uma activação da via do Akt entre as 4 e as 12 hpi (comparativamente às células da infecção controlo), atingindo o valor máximo às 8 hpi ( $p < 0,05$ ) (Figura 30D).

Embora sem significância estatística, a infecção com o vírus B/Lisboa/08/2006 apresenta, surpreendentemente, valores de activação da via do Akt superiores aos registados na infecção com o vírus A/Portugal/82/2009, durante este mesmo período. A única diferença na activação da via do Akt, entre a infecção pelos dois vírus, foi registada às 16 hpi, onde ocorreu um segundo pico de activação desta via na infecção com o vírus A/Portugal/82/2009. Este segundo pico deve-se a um aumento dos níveis de fosforilação do Akt na infecção com o vírus A/Portugal/82/2009, enquanto que na infecção com o vírus B/Lisboa/08/2006, os níveis de fosforilação do Akt continuam a decrescer (Figura 30B).

A activação da via de sobrevivência do Akt pode explicar o atraso observado na indução da apoptose na infecção com o vírus A/Portugal/82/2009, no entanto não explica a diferença detectada entre os perfis de indução de apoptose entre os dois vírus, pois esta via de sobrevivência também está activa na infecção com o vírus B/Lisboa/08/2006, e não foi suficiente para inibir a indução da apoptose na fase inicial da infecção.



**Figura 30** – A infecção com os vírus A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006 induz um perfil inicial de activação da via do Akt semelhante para os dois vírus. Extractos totais de células MDCK-SIAT1 infectadas com os vírus A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006 foram recolhidos durante 24 hpi e sujeitos a análise por *imunoblot* como descrito nas metodologias aplicadas. **A** – Detecção por imunofluorescência de p-Akt, Akt1/2 e  $\beta$ -Actina. **B** – Níveis de p-Akt1. **C** – Níveis de Akt1/2. **D** – Activação da via de sinalização do Akt calculada através da razão p-Akt1/Akt1/2 total.  $\beta$ -Actina foi usada como controlo para normalização da quantidade proteica aplicada no gel. Os valores apresentados nos gráficos referem-se ao valor médio  $\pm$  DPM de pelo menos três ensaios independentes. \*  $p < 0,05$  comparativamente a B/Lisboa/08/2006. Adaptado de Santos *et al.*, 2015 [124].

Estes resultados sugerem que o vírus B/Lisboa/08/2006 activa a via de sobrevivência celular do PI3K/Akt. No entanto, não é observado, no perfil cinético da indução da apoptose, um atraso na

indução da apoptose na infecção por este vírus. Neste contexto, foram analisados os alvos do Akt que estão descritos como estando directamente associados à sobrevivência celular: a activação do NF- $\kappa$ B [125, 126], a activação da proteína MDM2 que por sua vez vai inibir o p53 [76, 127], a inibição da pBad [77, 78] e a inibição da FoxO [78].

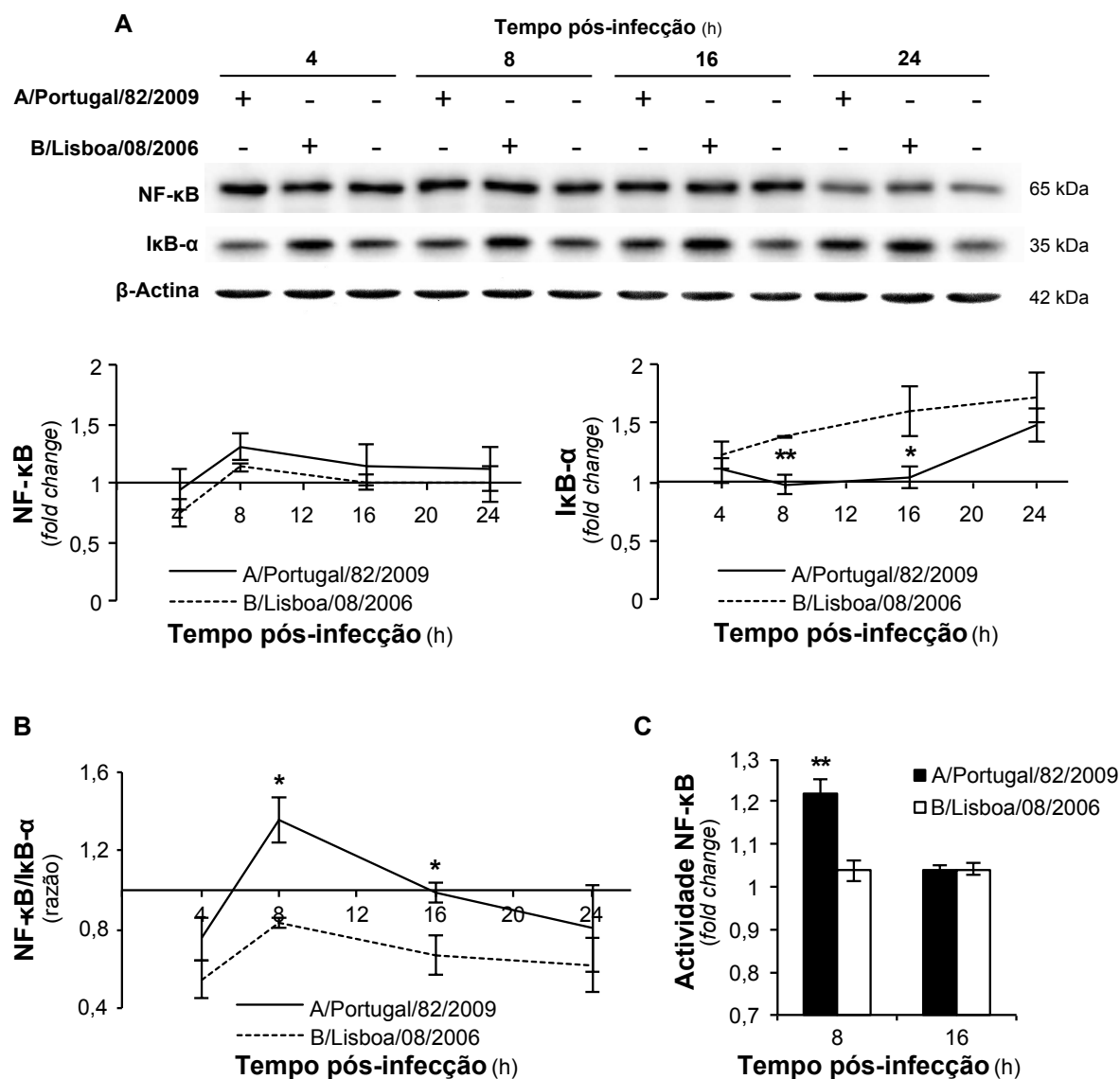
#### 5.3.2.2 Via de activação do NF- $\kappa$ B

Um dos factores chave para a replicação viral é o factor de transcrição NF- $\kappa$ B, também considerado como um dos principais reguladores da resposta imune inata de defesa contra a infecção. O factor de transcrição NF- $\kappa$ B é frequentemente activado pelos vírus de modo a haver uma regulação de vários genes antivirais [128]. Para verificar se as diferenças observadas entre o perfil de indução de apoptose na infecção com o vírus A/Portugal/82/2009 e na infecção com o vírus B/Lisboa/08/2006 estão dependentes deste factor de transcrição, os níveis de NF- $\kappa$ B e do seu inibidor endógeno, I $\kappa$ B, foram analisados e comparados para ambos os vírus.

A análise dos níveis de NF- $\kappa$ B e I $\kappa$ B- $\alpha$  (Figura 31A) indicam que a infecção com o vírus A/Portugal/82/2009 induz um pico na razão NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B- $\alpha$  às 8 hpi (Figura 31B). Na infecção com o vírus B/Lisboa/08/2006 também foi registado um pico na razão NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B- $\alpha$  às 8 hpi. No entanto, este pico foi inferior ao registado nas células infectadas com o vírus A/Portugal/82/2009 ( $p < 0,05$ ) e nas células controlo ( $p < 0,01$ ). Os valores da razão NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B- $\alpha$  foram igualmente inferiores aos registados na infecção com o vírus A/Portugal/82/2009 e células controlo, das 4 às 16 hpi ( $p < 0,05$ ) e das 4 às 24 hpi ( $p < 0,01$ ), respectivamente. O perfil observado na infecção com o vírus B/Lisboa/08/2006 pode ser explicado pelo aumento contínuo dos níveis de I $\kappa$ B- $\alpha$  após a infecção com este vírus (Figura 31A).

Para confirmar se o aumento observado da razão NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B- $\alpha$  reflecte um aumento na actividade do NF- $\kappa$ B, a actividade de transcrição do NF- $\kappa$ B foi analisada pós-infecção com o vírus B/Lisboa/08/2006, A/Portugal/82/2009 e controlo. A aplicação do ensaio TransAM<sup>TM</sup> NF- $\kappa$ B confirmou a activação do factor de transcrição NF- $\kappa$ B às 8 hpi na infecção com o vírus A/Portugal/82/2009 ( $1,22 \pm 0,04$  vezes superior ao controlo), ao contrário do que acontece na infecção com o vírus B/Lisboa/08/2006 ( $1,01 \pm 0,04$  vezes superior ao controlo) ( $p < 0,05$ ) (Figura 31C). Estes resultados indicam que a via de sobrevivência do NF- $\kappa$ B poderá explicar as diferenças observadas nos perfis de indução da apoptose pela infecção com o vírus A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006. A análise da

expressão proteica permite, ainda, apontar que a regulação do I $\kappa$ B, poderá estar envolvida no controlo da activação da via de sobrevivência do NF- $\kappa$ B.

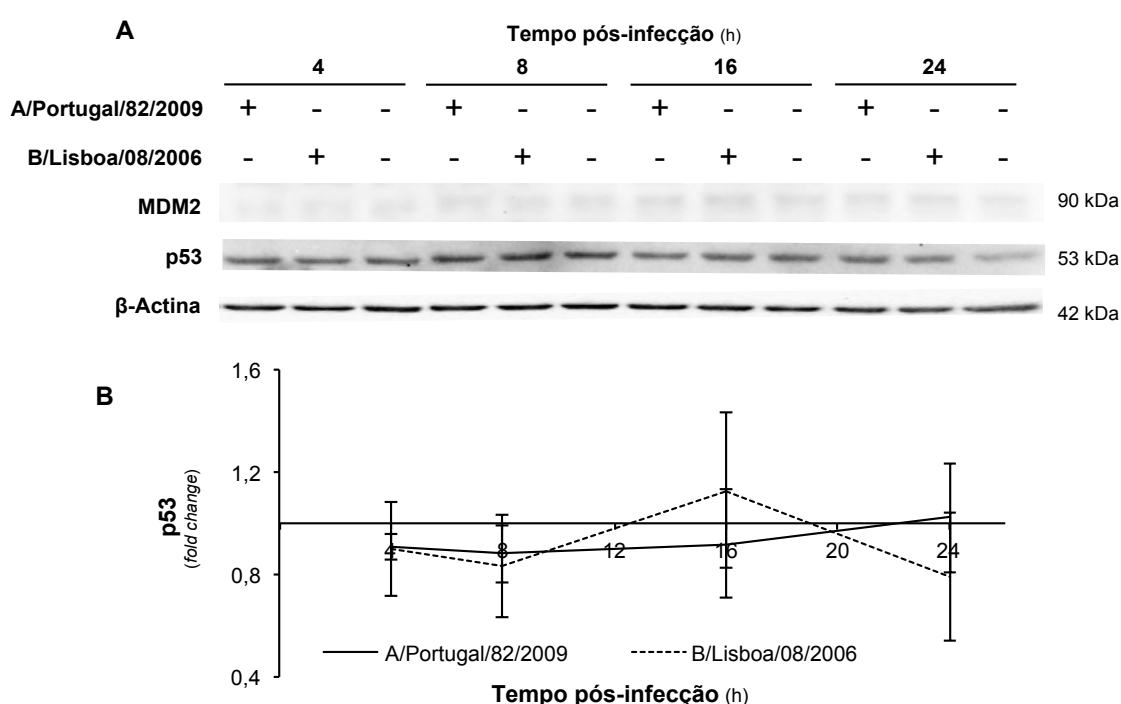


**Figura 31** – Células infectadas com o vírus A/Portugal/82/2009 e células infectadas com o vírus B/Lisboa/08/2006 apresentam diferentes perfis de activação da via do NF- $\kappa$ B. Extractos totais de células MDCK-SIAT1 infectadas com os vírus A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006 foram recolhidos durante 24 hpi e sujeitos a análise por *immunoblot* e por ensaios de actividade do NF- $\kappa$ B como descrito nas metodologias aplicadas. **A** – Detecção por imunofluorescência (em cima) e respectiva quantificação (em baixo) de NF- $\kappa$ B (esquerda) e I $\kappa$ B- $\alpha$  (direita).  $\beta$ -Actina foi usada como controlo para normalização da quantidade proteica aplicada no gel. **B** – Razão NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B- $\alpha$ . **C** – Níveis de NF- $\kappa$ B com capacidade de ligação à região de DNA consensus específica para o NF- $\kappa$ B, determinados através do ensaio TransAM<sup>TM</sup> NF- $\kappa$ B p65. Os valores apresentados nos gráficos referem-se ao valor médio  $\pm$  DPM de pelo menos três ensaios independentes. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  comparativamente a B/Lisboa/08/2006. Adaptado de Santos *et al.*, 2015 [124].

### 5.3.2.3 Via de activação da MDM2 e inibição do p53

A Mdm2, ubiquitina ligase do p53, que regula o equilíbrio intracelular do p53, é um substrato do Akt, levando a que a activação do Akt esteja associada à redução dos níveis de p53 [72]. Quando o equilíbrio intracelular do p53 é alterado, por estímulos intrínsecos ou extrínsecos de *stress* celular, poderá ocorrer inibição do ciclo celular, senescência celular ou indução da apoptose [72, 129].

Após a observação da activação da via do Akt na infecção como os vírus A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006, resultado que não reflecte o perfil cinético de indução da apoptose observado, foi-se avaliar se haveria alguma influência viral na via do MDM2/p53 através da análise por *immunoblot* destas duas proteínas nos extractos celulares de células infectadas com ambos os vírus. O anticorpo primário da proteína MDM2 não foi reactivo o suficiente com os extractos celulares utilizados (células MDCK-SIAT1 – provenientes de rim de cão), tendo-se conseguido apenas bandas muito ténues com intensidade insuficiente para a sua quantificação por densimetria (Figura 32A).



**Figura 32** – Células infectadas com o vírus A/Portugal/82/2009 e células infectadas com o vírus B/Lisboa/08/2006 não apresentaram diferentes perfis de activação da via MDM2/p53. Extractos totais de células MDCK-SIAT1 infectadas com os vírus A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006 foram recolhidos durante 24 hpi e sujeitos a análise por *immunoblot* como descrito nas metodologias aplicadas. **A** – Detecção por imunofluorescência das proteínas MDM2 e p53. **B** – quantificação de p53.  $\beta$ -Actina foi usada como controlo para normalização da quantidade proteica aplicada no gel. Os valores apresentados no gráfico referem-se ao valor médio  $\pm$  DPM de pelo menos três ensaios independentes.

Os níveis da proteína p53, embora sem resultados estatisticamente significativos, parecem apontar para uma inibição inicial do p53, de acordo com a activação inicial do Akt, para ambos os vírus. Igualmente sem significância estatística foi observado um aumento dos níveis de p53 entre as 8 e as 16 hpi que poderia ajudar a interpretar as diferenças observadas no perfil cinético de indução da apoptose observada entre as duas estirpes virais em estudo (Figura 32A e B).

#### 5.3.2.4 Via de activação da FoxO e da pBad

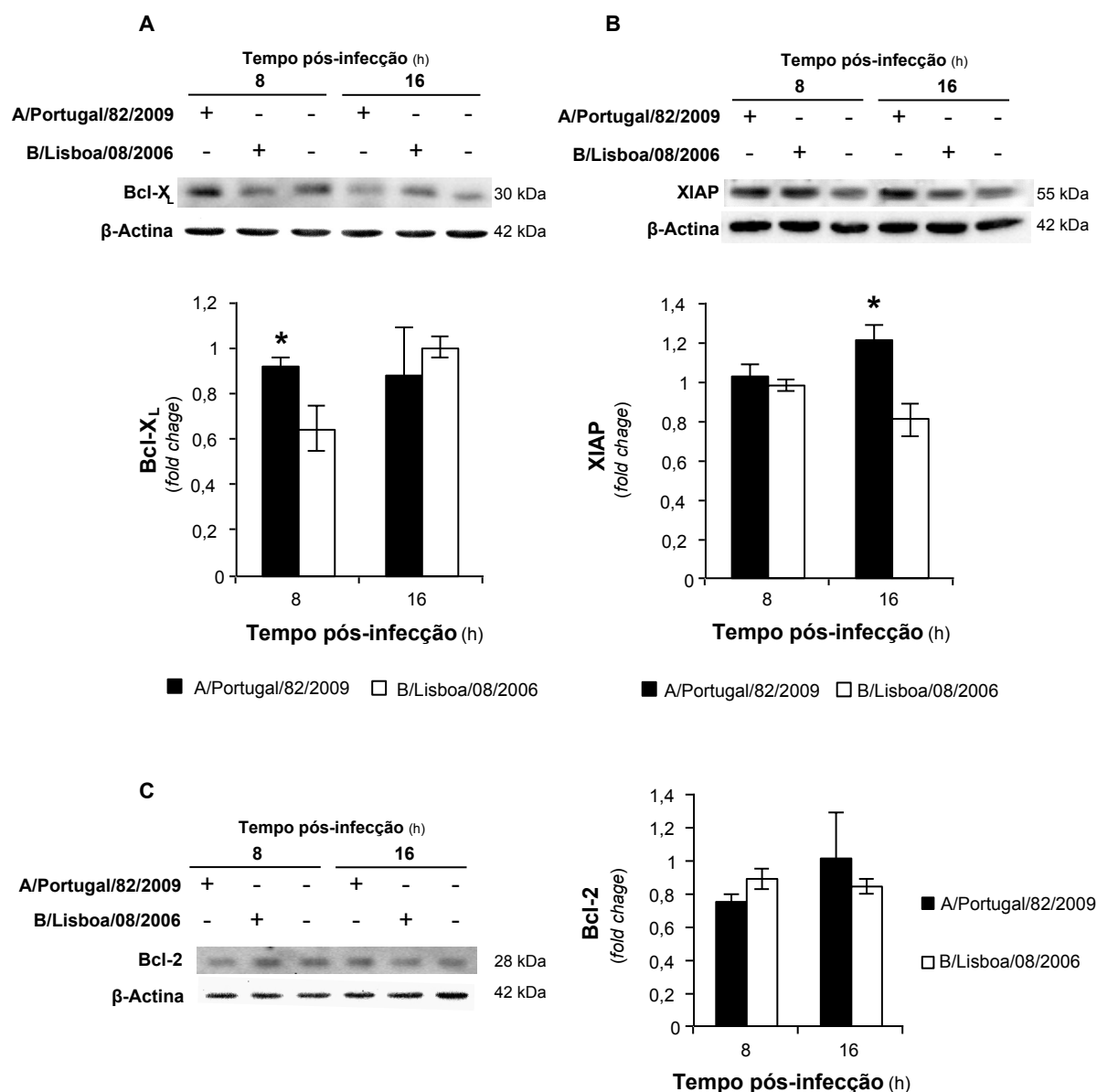
A activação da via do Akt poderá ainda inibir a actividade transcriptacional da FoxO, levando à sobrevivência, crescimento e proliferação celular, pois a FoxO, induz a apoptose e/ou a inibição do crescimento celular através da indução da transcrição de vários membros pró-apoptóticos da família da Bcl-2 [73]. Outra das vias da inibição da apoptose é a inibição da pBad pelo Akt [74, 75]. A proteína Bad é um membro do grupo dos factores pró-apoptóticos da família da Bcl-2 que, em resposta a estímulos apoptóticos, migra para a mitocôndria levando à morte celular por apoptose [75, 130].

A análise por imunoblot da FoxO e da pBad nos extractos celulares infectados com os vírus em estudo não foi bem sucedida. Após várias tentativas da revelação das membranas com diferentes reagentes de detecção, não foi possível revelar estas proteínas nas membranas, indicando que os anticorpos primários utilizados são pouco reactivos face aos níveis de FoxO e pBad das células utilizadas neste estudo, MDCK-SIAT1.

#### 5.3.2.5 Expressão de genes associados à sobrevivência celular

Para analisar as diferenças nos mecanismos de regulação da apoptose entre a infecção com o vírus A/Portugal/82/2009 e o vírus B/Lisboa/08/2006, nomeadamente o envolvimento da activação do NF- $\kappa$ B, foram analisados ao longo do período pós-infecção, os níveis de expressão dos genes alvo do NF- $\kappa$ B associados à sobrevivência celular, incluindo a Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-2 e XIAP. Apesar dos níveis da expressão proteica da Bcl-2 não apresentarem diferenças estatisticamente significativas entre a infecção com o vírus A/Portugal/82/2009 e a infecção com o vírus B/Lisboa/08/2006, os níveis de expressão da Bcl-X<sub>L</sub> e da XIAP foram diferentes entre a infecção com os dois vírus (Figura 33).





**Figura 33** – A infecção com o vírus A/Portugal/82/2009 induz a expressão de níveis mais elevados dos genes alvo do NF-κB associados à inibição da apoptose, Bcl-X<sub>L</sub> e XIAP. Extractos totais de células MDCK-SIAT1 infectadas com os vírus A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006 foram recolhidos durante 24 hpi e sujeitos a análise por *imunoblot* como descrito nas metodologias aplicadas. Detecção por imunofluorescência (cima) e respectiva quantificação (baixo) dos níveis de expressão de Bcl-X<sub>L</sub> (**A**), XIAP (**B**) e Bcl-2 (**C**). β-Actina foi usada como controlo para normalização da quantidade proteica aplicada no gel. Os valores apresentados nos gráficos referem-se ao valor médio ± DPM de pelo menos três ensaios independentes. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  comparativamente a B/Lisboa/08/2006. Adaptado de Santos *et al.*, 2015 [124].

Às 8 hpi a infecção com o vírus B/Lisboa/08/2006 reduziu aproximadamente em 40% os níveis de expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-X<sub>L</sub>, comparativamente aos valores obtidos na infecção controlo. Os níveis de expressão desta proteína foram igualmente inferiores aos observados na infecção com o vírus A/Portugal/82/2009 ( $p < 0,05$ ). Os níveis de expressão da proteína XIAP

aumentaram e diminuíram aproximadamente 20% na infecção com o vírus A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006, respectivamente, das 8 às 16 hpi ( $p < 0,05$ ).

Estes resultados sugerem redes distintas de regulação da apoptose entre a infecção com o vírus A/Portugal/82/2009 e o vírus B/Lisboa/08/2006, e suportam o papel do fator de sobrevivência NF- $\kappa$ B e dos seus genes alvos em retardar o início da indução da apoptose na infecção com o vírus A/Portugal/82/2009, comparativamente à infecção com o vírus B/Lisboa/08/2006.

### **5.3.3 Estudo dos componentes virais que influenciam as diferenças na indução da apoptose**

Detectadas diferenças no perfil de indução da apoptose entre infecção com o vírus A/Portugal/82/2009 e o vírus B/Lisboa/08/2006, assim como nalgumas das vias intracelulares estudadas anteriormente, analisou-se que gene viral poderia estar implicado nestes resultados. Inicialmente, estudou-se o envolvimento da proteína NS1 (descrita como estando implicada na inibição da indução da apoptose numa fase inicial da infecção nos vírus influenza do tipo A), e numa fase posterior analisou-se o efeito isolado que cada gene viral tem na indução/inibição da apoptose.

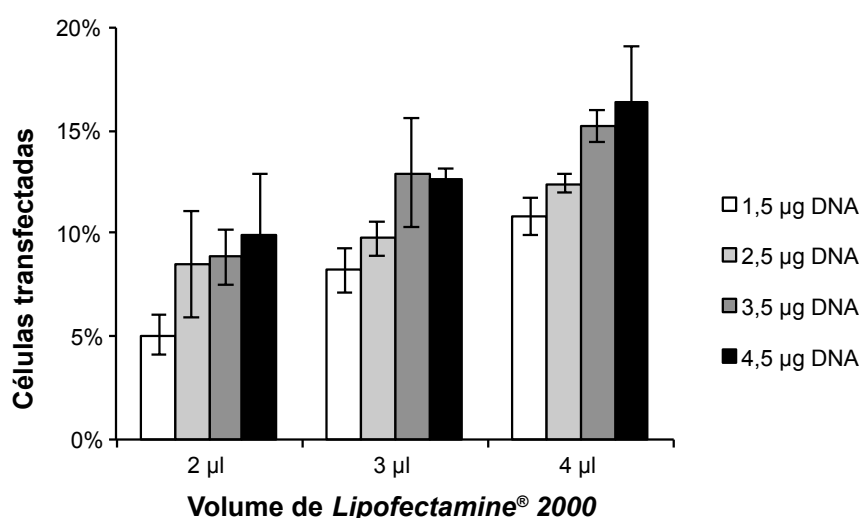
#### 5.3.3.1 Efeito da NS1 na activação do NF- $\kappa$ B

Dos mecanismos celulares estudados anteriormente, foi a nível da activação do NF- $\kappa$ B que se verificaram diferenças entre os vírus em estudo que possam justificar o atraso observado na indução da apoptose na infecção com o vírus A/Portugal/82/2009. A proteína NS1A tem estado associada a uma inibição da apoptose na fase inicial da infecção através da interacção com o PI3K [70, 71, 131]. Começou por se verificar se, devido à divergência genética entre NS1A e a NS1B, esta proteína influenciava a activação do NF- $\kappa$ B. Para tal, células MDCK-SIAT1 foram transfectadas com o plasmídeo *pCIPolISapIT\_NS1\_A*, *pCIPolISapIT\_NS1\_B* e *pCIPolISapIT\_GFP* e analisadas por imunocitoquímica, de modo a detectar a translocação do NF- $\kappa$ B do citoplasma para o núcleo. O NF- $\kappa$ B, quando activo, migra para o núcleo celular para activar a transcrição e expressão dos genes associados à sobrevivência celular.

#### *Aferição das condições de transfecção*

De modo a garantir a máxima rentabilidade da transfecção, foi necessário aferir as condições ideais de transfecção das células MDCK-SIAT1. Na Figura 34 estão representados, graficamente, os

resultados desta aferição. A percentagem de células transfectadas aumenta com o aumento da quantidade de *Lipofectamine*® 2000 utilizada, para todas as quantidades de DNA plasmídico testado. O mesmo foi observado para as várias quantidades de DNA plasmídico. No entanto, a condição seleccionada para a continuação do trabalho foi a utilização de 4 µl de *Lipofectamine*® 2000 por poço e de 3,5 µg de cada DNA plasmídico por poço, pois registou-se uma maior taxa de transfecção (15%).



**Figura 34** – Aferição da co-transfecção do plasmídeo controlo (*pCIPolISapIT*) com o plasmídeo repórter (*pCIPolISapIT\_GFP*) em células MDCK-SIAT1. Foram testados três volumes diferentes de *Lipofectamine*® 2000 e quatro quantidades de DNA plasmídico, como aconselhado pelo fabricante.

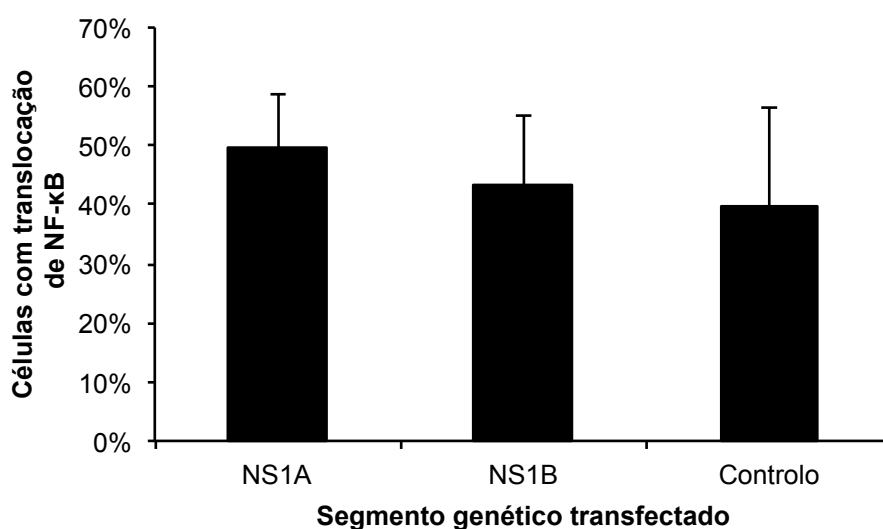
#### *Activação do NF-κB pela proteína NS1A e NS1B*

O NF-κB encontra-se normalmente no citoplasma celular ligado ao seu inibidor IκB. Na presença de estímulo de sobrevivência, a IKK cinase vai degradar o IκB, o que permite a migração do NF-κB livre para o núcleo celular. Devido à baixa taxa de transfecção do modelo celular utilizado, recorreu-se à co-transfecção das células com o plasmídeo em estudo, juntamente com o plasmídeo repórter, *pCIPolISapIT\_GFP*, de modo a ser possível a detecção da activação do NF-κB apenas nas células transfectadas.

Os resultados de imunocitoquímica encontram-se resumidos graficamente na Figura 35 e não revelaram diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ , análise ANOVA) na translocação do factor de transcrição nuclear NF-κB do citoplasma para o núcleo, entre as células transfectadas com

o plasmídeo com o gene da proteína NS1A, com o gene da proteína NS1B e com o plasmídeo controlo.

Nas células transfectadas com o plasmídeo que codifica a NS1A, nas células transfectadas com o plasmídeo que codifica a NS1B e nas células controlo, a percentagem de translocação do factor de transcrição NF- $\kappa$ B do citoplasma para o núcleo das células transfectadas foi idêntica, variando entre os 40 e os 50%.



**Figura 35** – Translocação de NF- $\kappa$ B do citoplasma para o núcleo em células transfectadas com o plasmídeo que codifica o gene da proteína NS1A, com o plasmídeo que codifica o gene da proteína NS1B e com o plasmídeo controlo. Os valores apresentados nos gráficos referem-se ao valor médio  $\pm$  DPM de pelo menos três ensaios independentes.

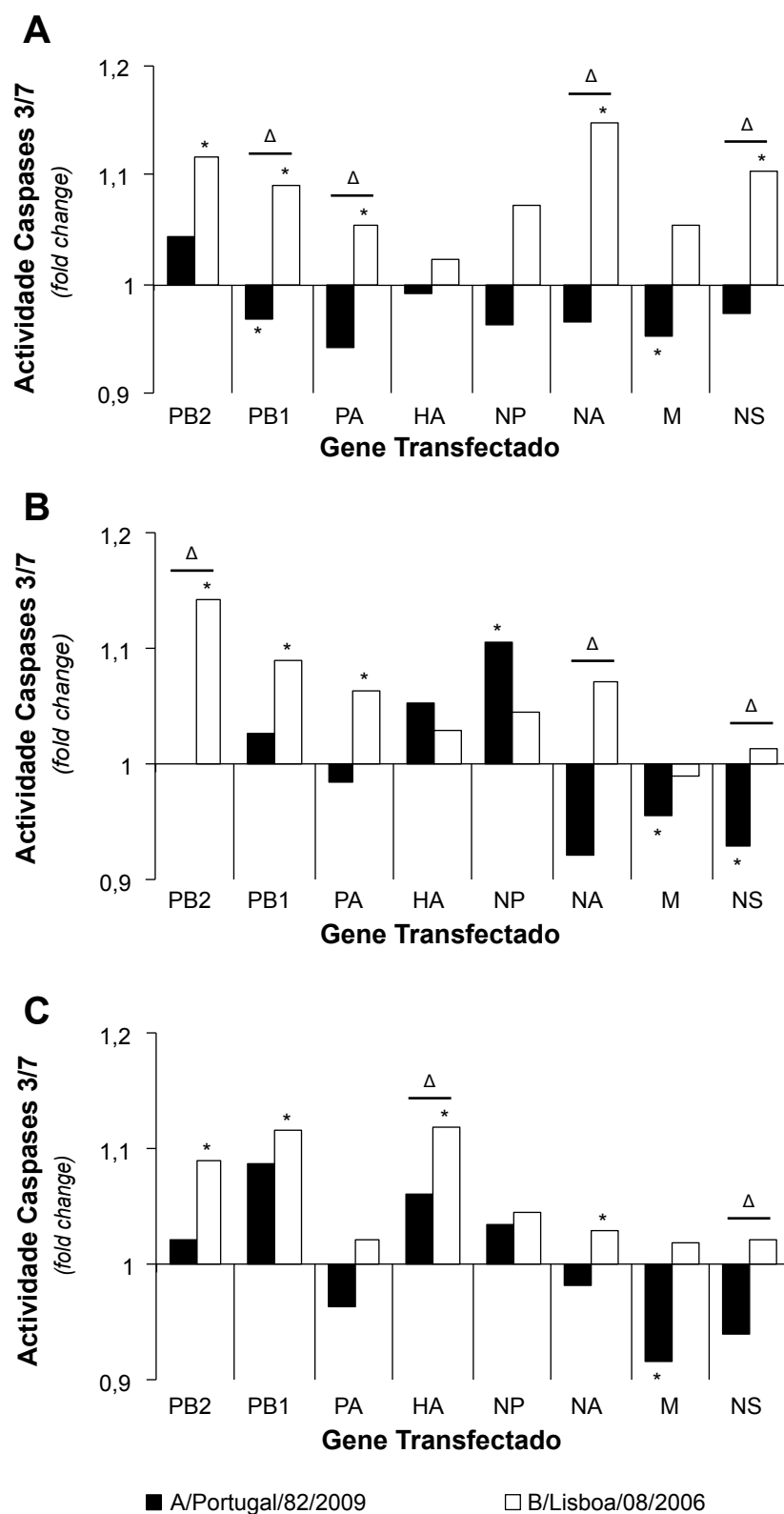
Embora os dados revelem um maior número de células com translocação do factor de transcrição NF- $\kappa$ B nas células co-transfectadas com o gene da proteína NS1A, do que nas células transfectadas com o gene da proteína NS1B e controlo, estas diferenças não são estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ , análise ANOVA). Estes resultados não permitem determinar se as diferenças observadas na indução da apoptose entre a infecção com o vírus A/Portugal/82/2009 e o vírus B/Lisboa/08/2006 se deve a efeitos induzidos/provocados pela proteína NS1 dos vírus influenza na activação/inibição do factor de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B.

### 5.3.3.2 Efeito dos diferentes genes virais na activação/inibição da apoptose

Após o estudo do efeito da NS1A e NS1B, na activação da via do NF- $\kappa$ B, foi-se verificar, recorrendo à medição da actividade das caspases 3/7 (caspases efectoras – sinal de activação do processo apoptótico), o efeito de cada gene viral na indução da apoptose. Com este estudo pretendeu-se, não só identificar o gene viral que poderá contribuir para a inibição da apoptose na fase inicial da infecção, no vírus A/Portugal/82/2009, como também identificar no vírus B/Lisboa/08/2006 quais os genes que mais contribuem para a indução/activação da apoptose celular na fase inicial da infecção por este vírus.

Os resultados do efeito da transfecção de cada segmento viral na indução/inibição da apoptose estão representados graficamente na Figura 36, distribuídos pelos *timepoints* estudados: 8 hpt (Figura 36A), 16 hpt (Figura 36B) e 24 hpt (Figura 36C). Todos os genes virais do vírus B/Lisboa/08/2006, com excepção do gene M às 16 hpt, parecem induzir/activar o processo apoptótico em todos os tempos estudados. Todos os genes do vírus A/Portugal/82/2009, com excepção do gene PB2, parecem inibir o processo apoptótico na fase inicial da transfecção (8 hpt), com significância estatística ( $p < 0,05$ ) para alguns genes/tempos pós-infecção.

Com significância estatística ( $p < 0,05$ ), verificou-se: (1) na transfecção com os genes do vírus A/Portugal/82/2009, o gene M do vírus A/Portugal/82/2009 inibiu a apoptose em todos os tempos pós-transfecção estudados, os genes PB1 e NS inibiram a apoptose às 8 e 16 hpt, respectivamente, e apenas foi observada uma indução da apoptose por parte do gene NP às 16 hpt; (2) nos vírus B/Lisboa/08/2006, os genes do complexo da polimerase induziram a apoptose em todos os tempos pós-transfecção analisados (excepto o gene PA às 24 hpt), também se registou uma indução na apoptose na transfecção das células com o gene NS às 8 hpt, o gene da NA às 8 e 24 hpt e o gene da HA às 24 hpt; e (3) observando os resultados dentro do mesmo gene para os dois vírus em estudo, nos genes onde se observou uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), a actividade das caspases efectoras 3/7 é sempre superior para o vírus B/Lisboa/08/2006, esta diferença foi registada na transfecção com o gene NS em todos os tempos pós-transfecção, com o gene NA às 8 e 16 hpt, com o gene PB1 e PA às 8 hpt, com o gene PB2 às 16 hpt e com o gene HA às 24 hpt.



**Figura 36** – Representação gráfica da inibição/indução da apoptose (actividade das caspases efectoras 3/7) por cada gene do vírus A/Portugal/82/2009 e B/Lisboa/08/2006 8, 12 e 24 horas pós-transfecção (**A**, **B** e **C**, respectivamente). \* -  $p < 0,05$ , comparativamente ao controlo negativo,  $\Delta$  -  $p < 0,05$  entre o vírus A/Portugal/82/2009 e o vírus B/Lisboa/08/2006 (análise *t-student*).

## **5.4 Discussão**

### **5.4.1 Diferenças na indução da apoptose entre vírus influenza A e vírus influenza do tipo B**

A diversidade genética e epidemiológica entre os vírus influenza do tipo A e os vírus influenza do tipo B, assim como o número elevado de estudos que descrevem a interacção dos vírus influenza do tipo A (subtipos A(H3N2), A(H1N1) sazonal e A(H5N1)) com a inibição/indução do mecanismo de apoptose, deram origem ao ponto de partida deste estudo que começou com a análise da diferença na indução/inibição deste mecanismo celular entre os vírus influenza do tipo A (da variante pandémica A(H1N1)pdm09) e os vírus influenza do tipo B.

Os resultados apresentados descrevem, pela primeira vez, o perfil cinético de indução da apoptose pelos vírus da nova variante pandémica A(H1N1)pdm09 e a sua comparação com os vírus influenza do tipo B. A análise da morte celular total e da percentagem de células em apoptose mostraram que o vírus influenza do tipo B induz a morte celular total e a apoptose mais cedo, no período pós-infecção, que o vírus do tipo A. No entanto, a partir do momento em que o vírus do tipo A entra em processo de morte celular e apoptose, regista valores superiores aos obtidos para o vírus do tipo B. Os dados da diferença entre a indução da apoptose pela infecção com o vírus do tipo A e do tipo B foram confirmados, a nível molecular, com o estudo da actividade das caspases efectoras 3/7, marcadores bioquímicos da activação do mecanismo da apoptose na célula infectada. Os resultados da actividade das caspases efectoras confirmaram a diferença na indução da apoptose entre a infecção com o vírus influenza do tipo A e com o vírus influenza do tipo B. Enquanto que a infecção com o vírus do tipo B induz o aumento imediato da actividade das caspases 3/7, a infecção com o vírus do tipo A induz o aumento da actividade das caspases 3/7 num período mais tardio da infecção. Igualmente foi analisada a actividade das caspases iniciadoras 8 e 9, associadas à activação da via extrínseca e intrínseca, respectivamente, da apoptose. A análise da actividade das caspases iniciadoras mostrou que na infecção com o vírus do tipo B ocorre a activação, numa fase inicial da infecção, de ambas as vias de activação da apoptose. Na infecção com o vírus do tipo A verificou-se que a actividade das caspases iniciadoras mantém-se praticamente inalterada na fase inicial da infecção ocorrendo, numa fase mais tardia, um aumento acentuado da activação da via intrínseca, acompanhada por um ligeiro aumento da activação da via extrínseca.

Estes resultados mostram uma divergência na indução da apoptose, entre a infecção por vírus influenza do tipo A e do tipo B, em termos de tempo pós-infecção em que esta ocorre, assim como

de mecanismo de indução da apoptose que é activado. Enquanto na infecção com o vírus influenza do tipo B, a indução da apoptose ocorre numa fase inicial da infecção, com o recrutamento de ambas as vias de activação (a via intrínseca e a via extrínseca), na infecção com o vírus influenza do tipo A, observa-se um atraso na indução da apoptose, para combater a resposta celular antiviral na fase inicial da infecção conduzindo a uma melhor replicação, tal como também é descrito na literatura [60, 70]. Quando a indução da apoptose ocorre, dá-se, maioritariamente, pela activação da via intrínseca. A indução inicial da via extrínseca na infecção com o vírus influenza do tipo B mostra a incapacidade destes vírus inibirem a morte celular causada por esta via. A via extrínseca de activação da apoptose tem sido associada à resposta inata antiviral da célula. Esta resposta celular leva à produção de interferão (IFN)  $\alpha$ , IFN $\beta$  e citocinas capazes de induzir a apoptose pela via do TRAIL (*TNF-related apoptosis ligand*), que por sua vez desencadeia a via extrínseca de activação da apoptose através da via dos receptores de morte celular [132, 133]. Por sua vez, a activação da via extrínseca só foi detectada na infecção com o vírus influenza do tipo A 56 hpi, mostrando a capacidade que estes vírus têm de impedir a resposta inata antiviral da célula.

Recentemente, num estudo idêntico, El-Sayed *et al.*, 2016 [134] corrobora os resultados apresentados neste trabalho mostrando que o perfil observado nos vírus influenza do tipo A neste trabalho (utilizando uma estirpe da nova variante A(H1N1)pdm09) pode ser extrapolado para os influenza do subtipo A(H3N2), apontando para uma conservação do perfil de indução da apoptose dentro dos vírus influenza do tipo A [134]. O mesmo sucede nos vírus influenza do tipo B, tendo, o estudo referido, utilizado uma estirpe da linhagem B/Yamagata, obtendo um perfil de indução da apoptose idêntico ao obtido para a estirpe utilizada neste trabalho (B/Lisboa/08/2006), representante da linhagem B/Victoria [134].

#### **5.4.2 Vias celulares envolvidas na indução da apoptose pelos vírus influenza**

O atraso observado na indução da apoptose pelo vírus do tipo A, apoia a hipótese deste trabalho, no que concerne à existência de diferenças na indução da apoptose entre vírus influenza do tipo A e do tipo B. O ponto de partida para este trabalho apoiou-se no facto da NS1A ter um domínio de ligação à unidade p85 $\beta$  do PI3K, levando à activação do factor de sobrevivência celular Akt; e na diferença genética entre a NS1A e NS1B, nomeadamente a ausência de domínios descritos na NS1B que interajam e activem esta via [70, 135, 136]. Estes dois factos seriam a base para a diferença



observada na indução da apoptose pelos dois tipos de vírus influenza. Neste contexto, analisou-se o efeito da infecção celular com vírus influenza do tipo A e do tipo B na via de sobrevivência celular do PI3K/Akt.

A activação da via de sobrevivência celular do PI3K/Akt foi detectada, na mesma intensidade, para ambos os tipos de vírus, numa fase inicial da infecção, ao contrário do esperado e do descrito anteriormente [137]. A activação, na fase inicial da infecção, da via do PI3K/Akt pode explicar o atraso na indução da apoptose observada anteriormente no estudo do perfil cinético de indução da apoptose. No entanto, estes resultados indicam que esta activação no vírus do tipo B não é suficiente para impedir a indução da apoptose na fase inicial da infecção, indicando que (1) o vírus do tipo A poderá recrutar mecanismos adicionais para bloquear a apoptose, e/ou (2) o estímulo apoptótico induzido pela infecção com o vírus do tipo B seja mais forte que o do tipo A levando a que a activação da via do PI3K/Akt seja insuficiente para compensar esse estímulo.

Dos alvos do Akt estudados que estão directamente associados à sobrevivência celular, apenas a via do NF- $\kappa$ B mostrou resultados que poderão justificar o atraso observado no perfil cinético da indução da apoptose pelo vírus influenza do tipo A comparativamente com o do tipo B. Observou-se a activação desta via na infecção com o vírus do tipo A e não na infecção com o vírus do tipo B. Embora a activação da via do NF- $\kappa$ B tenha sido descrita como uma resposta celular antiviral na infecção com o vírus influenza do tipo A, estudos mais recentes apontam a activação desta via como necessária para a replicação viral através da transcrição de factores anti-apoptóticos, igualmente descrito apenas para os vírus influenza do tipo A [128, 133]. Concordantemente, comparativamente com os resultados obtidos para o vírus do tipo B, a infecção com o vírus do tipo A apresenta, na fase inicial da infecção, níveis superiores de transcrição das proteínas anti-apoptóticas Bcl-X<sub>L</sub> e XIAP, proteínas de sobrevivência cuja transcrição se encontra associada à activação da via do NF- $\kappa$ B. Os resultados obtidos mostram, ainda, que a infecção com o vírus influenza do tipo A apenas está associada com o atrasar da indução da apoptose e não com um aumento da resistência à apoptose pelas células infectadas.

#### **5.4.3 Componentes virais implicados na indução da apoptose das células infectadas**

Os resultados obtidos no estudo do efeito de cada segmento genético viral na indução da apoptose das células transfectadas apoiam a hipótese deste trabalho referente ao papel do gene que codifica a

proteína NS1 nas diferenças da indução da apoptose entre o vírus influenza do tipo A e o vírus influenza do tipo B. Em todos os tempos pós-transfecção estudados, foi observada uma diferença, estatisticamente significativa, na actividade das caspases 3/7 nas células transfectadas com o gene NS, sendo a actividade registada nas células transfectadas com o gene NS do vírus do tipo B superior à do vírus do tipo A.

Inesperadamente, em todos os *timepoints*, foi observada (com significância estatística) a inibição da indução da apoptose nas células transfectadas com o gene M do vírus do tipo A. Não há, até à data, estudos que associem este segmento genético, que codifica a proteína M1 (matriz) e M2 (proteína que forma um canal iónico na membrana externa dos vírus influenza) à inibição da apoptose. No entanto, Gannage *et al.*, 2009 [95] demonstraram que a proteína M2 dos vírus influenza do tipo A inibe a fusão dos autofagossomas (contendo as partículas virais), com os lisossomas celulares, levando a um acumular de autofagossomas na células, que na fase inicial da infecção permite uma replicação viral mais eficiente [95]. Embora, no processo de transfecção isolada dos genes não haja a formação de partículas virais nos autofagossomas, os resultados obtidos indicam que o gene que codifica a proteína M2 também tem um papel fundamental na inibição da apoptose na fase inicial da infecção, através da indução de vias/factores anti-apoptóticos, ou através da inibição de vias/factores pró-apoptóticos, que consequentemente poderão levar à inibição da fusão dos autofagossomas aos lisossomas como descrito anteriormente [95]. Igualmente, estudos revelaram que a proteína M1 dos vírus influenza do tipo A, também codificada pelo gene M, apresenta um domínio (que não se encontra presente no gene M dos vírus influenza do tipo B) capaz de se ligar à caspase iniciadora 8, associada à via extrínseca, não se conhecendo ainda se esta interacção terá consequências anti ou pro-apoptóticas [138].

Em relação à indução da apoptose pelos genes do vírus influenza do tipo A, apenas o gene NP teve um efeito de indução da apoptose. Recentemente, foi reportado que o gene NP dos vírus influenza do tipo A têm a capacidade de interagir com a ubiquitinina ligase RNF43, um dos inibidores celulares do p53. A interacção da proteína NP com a RNF43 faz com que esta liberte o factor pro-apoptótico p53 que, por sua vez, vai induzir a transcrição de genes pro-apoptóticos que conduzem à apoptose da célula infectada [139].

Outros genes estão descritos na literatura como indutores da apoptose nas infecções com vírus do tipo A, como por exemplo a HA e NA [90, 92]. Neste estudo, a expressão destes genes não mostrou

resultados estatisticamente significativos que apoiem estes dados. No entanto, observou-se, quer na transfecção com o gene da NA (às 8 e 12 hpt), quer na transfecção com o gene da HA (às 24 hpt), uma diferença estatisticamente significativa entre a indução da apoptose pelos genes referidos entre os do tipo A e os do tipo B, em que os genes do tipo B induziram mais apoptose que os do tipo A. Foi possível, ainda, verificar que todos os genes do vírus influenza do tipo B tiveram uma tendência de indução da apoptose em todos os tempos pós-transfecção analisados, destacando-se os genes do complexo da polimerase (PB2, PB1 e PA), com um papel estatisticamente significativo (excepto PA nas 24 hpt). Este resultado indica-nos, aparentemente, que os vírus do tipo B poderão não apresentar qualquer tipo de defesa contra a resposta celular antiviral, no que diz respeito à inibição/anulação desta resposta. Estes resultados apontam, ainda, para que nos vírus influenza do tipo B, o controlo da apoptose pelo vírus poderá não ser necessário para a sua replicação, pois o vírus consegue replicar-se sem a necessidade de controlar a resposta celular antiviral. O facto de não contrariarem a resposta celular antiviral poderá estar relacionado com a menor patogenicidade associada a este tipo de vírus influenza, comparativamente com os vírus do tipo A, pois a resposta celular antiviral inata irá recrutar o sistema imunitário para combater a doença mais rapidamente. Foi, ainda, possível observar outra tendência, sem significado estatístico, em que no primeiro tempo em estudo pós transfecção (8 hpt), todos os genes do vírus do tipo A (com excepção do gene PB2) tendem a inibir a actividade da caspase 3/7 (apoptose), enquanto que todos os genes do vírus influenza do tipo B tendem a induzir a apoptose.

Os resultados obtidos, vão de encontro aos perfis de indução da apoptose obtido nas infecções com vírus influenza do tipo A e do tipo B, apontando as proteínas transcritas pelos genes M e NS dos vírus influenza do tipo A, como possíveis componentes virais que poderão levar à inibição da apoptose e as proteínas transcritas pelos genes PB2, PB1 e PA dos vírus influenza do tipo B, como possíveis componentes virais que poderão levar à indução da apoptose.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

## **6 Considerações finais**

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

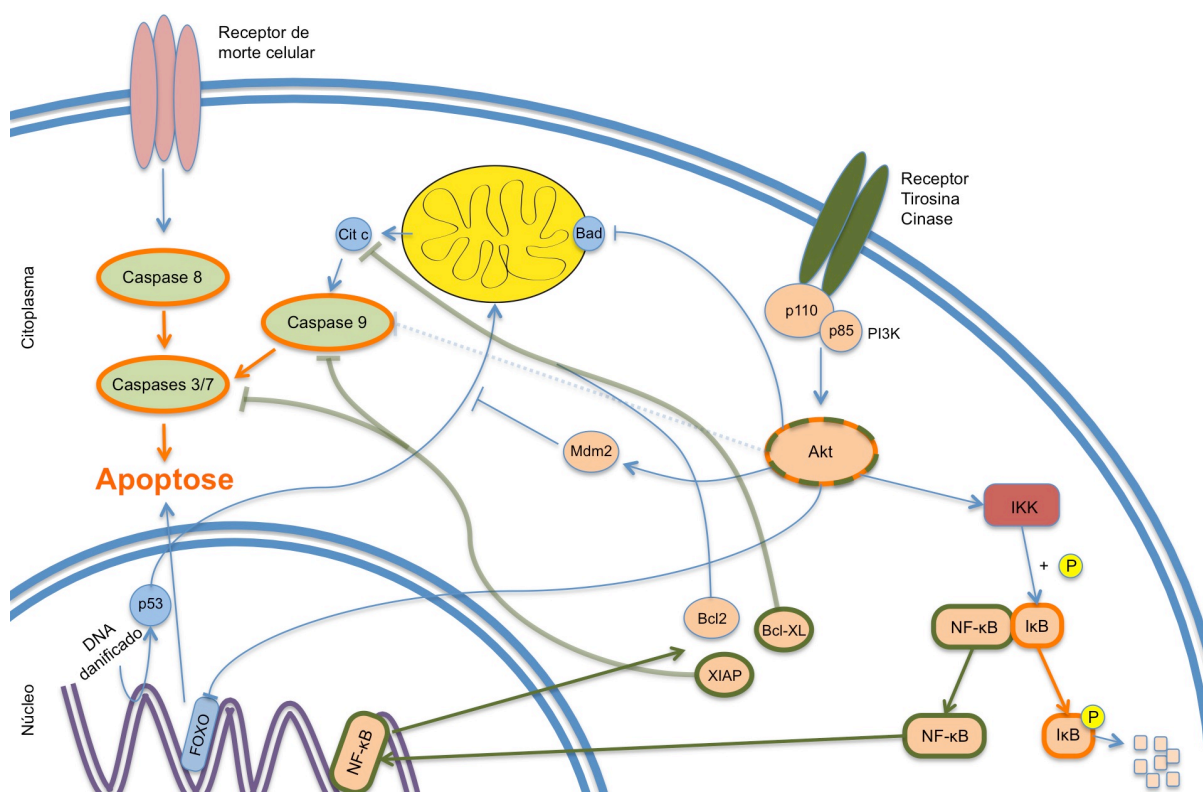
Com este trabalho foi possível verificar que as estirpes da nova variante A(H1N1)pdm09 circulantes em Portugal no início da pandemia de 2009, bem como a maioria das estirpes circulantes a nível global, apresentam o mesmo background genético. A maioria das mutações detectadas já se encontravam descritas na literatura e foi detectada uma assinatura de evolução genética representante do *clade* evolutivo 7. No estudo genético da subunidade 1 da proteína antigénica HA foram detectadas algumas mutações nas estirpes portuguesas comparativamente à sequência nucleotídica da estirpe vacinal. No entanto, de acordo com a literatura, nenhuma dessas mutações conferia às estirpes um *drift* antigénico que levasse à redução da eficácia da vacina pandémica. Juntamente com a monitorização da proteína antigénica HA, monitorizou-se igualmente a proteína alvo dos antivirais específicos para a gripe, os inibidores da NA. No estudo da sequência nucleotídica da NA apenas foi detectada em duas estirpes um marcador molecular de redução da susceptibilidade aos inibidores da NA, a mutação I223V. A redução da susceptibilidade foi confirmada *in vitro*; no entanto, mostrou-se ser restrita a estas duas estirpes, não tendo sido incorporada na evolução do vírus no decorrer da pandemia.

Estes dados permitiram verificar que as estirpes circulantes a nível nacional não possuíam marcadores de patogenicidade, que pudessem agravar a virulência deste agente e que eram igualmente susceptíveis às duas armas de combate ao vírus durante a pandemia, a vacina pandémica e a utilização dos antivirais específicos para a gripe.

O estudo genético das estirpes da nova variante pandémica permitiu seleccionar uma estirpe nacional representativa para ser utilizada no estudo do efeito da infecção com vírus influenza na indução da apoptose nas células infectadas.

No estudo da indução da apoptose pelos vírus influenza, verificou-se que o vírus influenza do tipo B testado neste trabalho induziu a apoptose nas células infectadas na fase inicial da infecção, activando ambas as vias de apoptose, via intrínseca e extrínseca. Por sua vez, na infecção das células com o vírus influenza do tipo A verificou-se uma indução da apoptose mais tardia maioritariamente induzida pela activação da via intrínseca. Das vias celulares estudadas, verificou-se que ambos os vírus em estudo induziram a activação do Akt, no entanto, com o vírus influenza do tipo B verificou-se um aumento de I $\kappa$ B, inibidor do NF- $\kappa$ B. Na infecção com o vírus influenza do tipo A foi observada uma activação do factor de transcrição NF- $\kappa$ B, responsável pela transcrição de factores

pró-apoptóticos (XIAP e Bcl-XL) que se encontravam em maior concentração nas células infectadas com o vírus influenza do tipo A. Na Figura 37 estão representadas as vias celulares estudadas neste trabalho, com indicação das vias em que se observaram diferenças entre a infecção com o vírus influenza do tipo A e o vírus influenza do tipo B.



**Figura 37** – Representação esquemática das vias celulares estudadas. Na fase inicial da infecção há uma indução da apoptose pela infecção com o vírus influenza do tipo B quer pela via intrínseca que pela via extrínseca. Em ambas infecções observou-se uma activação do Akt, no entanto dos alvos do Akt, apenas a activação do factor de transcrição NF-κB foi observada na infecção com os vírus influenza do tipo A levando a um aumento dos factores pro-apoptóticos XIAP e Bcl-XL. A laranja e a verde estão representadas as vias activadas pela infecção com o vírus influenza do tipo B e do tipo A, respectivamente.

Em relação ao estudo isolado da influência de cada componente viral na indução da apoptose, verificou-se que a maioria das proteínas/RNAs virais do vírus influenza do tipo B induzem a apoptose nas células, enquanto que no vírus influenza do tipo A, observou-se uma inibição da apoptose pelas proteínas/RNAs virais M, NS e PB1.

Embora as diferenças observadas na cinética e vias de indução da apoptose induzidas pela infecção por vírus influenza do tipo A e do tipo B apontem para o envolvimento da via do IκB/NF-κB, estudos



adicionais e complementares são necessários para se esclarecer e perceber o mecanismo molecular que leva à acumulação de I $\kappa$ B na infecção com o vírus influenza do tipo B.

Tendo em conta o potencial pandémico dos vírus influenza do tipo A e a contínua ameaça de se ter que enfrentar uma próxima pandemia, é compreensível que a maioria dos estudos das interações vírus-hospedeiro e dos mecanismos de indução da apoptose sejam focados nos vírus influenza do tipo A. No entanto, os vírus influenza do tipo B também têm impacto na saúde pública, que não deve ser desprezado, pois co-circulam com os vírus do tipo A nas epidemias sazonais de gripe, nalgumas como tipo dominante. A identificação de novos mecanismos moleculares que sejam regulados por ambos os tipos de vírus influenza poderão revelar novas informações sobre pontos essenciais no controlo da apoptose pelos vírus influenza.

Contribuindo para o estado da arte, os resultados obtidos com este trabalho apontam a nível celular, a via do I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B, e a nível viral, os genes M e NS (inibição da apoptose nos vírus influenza do tipo A), e os genes PB2, PB1 e PA (indução da apoptose nos vírus influenza do tipo B), como possíveis responsáveis para as diferenças observadas no perfil de indução da apoptose. As diferenças na indução da apoptose poderão contribuir para explicar, em parte, a diferença existente entre a virulência dos vírus influenza do tipo A e a dos vírus influenza do tipo B.

Uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares que levam à regulação da apoptose, pelo vírus influenza do tipo A e pelo vírus influenza do tipo B, poderá revelar novos factores que contribuem para o sucesso da replicação vírus influenza, revelando assim novos alvos para o desenvolvimento de vacinas e drogas antivirais. A descoberta de novos alvos antivirais no vírus ou no hospedeiro será útil não só no contexto de uma pandemia, mas também no tratamento e na profilaxia das infecções por vírus influenza sazonal, contribuindo assim para um melhor controlo da doença.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

## **7 Referências bibliográficas**

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

1. WHO. *Fact Sheet - Influenza (Seasonal)*. 2016 [citado a 23/08/2017]; Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>.
2. George F, *Gripe*, em *História de Doenças Infecciosas*, F. Maltez e R. Almeida, Editors. 2014. p. 87-126.
3. Webster RG, Monto AS, Braciale TJ, Lamb RA, *Textbook of Influenza*. 2013: Wiley Blackwell.
4. Rebelo de Andrade H, Diniz A, Froes F, *Gripe*. 2003, Lisboa: Sociedade Portuguesa de Pneumologia.
5. Ferguson L, Olivier AK, Genova S, Epperson WB, Smith DR, *et al.*, *Pathogenesis of Influenza D Virus in Cattle*. J Virol, 2016. **90**(12): p. 5636-42.
6. Schrauwen EJ, Fouchier RA, *Host adaptation and transmission of influenza A viruses in mammals*. Emerg Microbes Infect, 2014. **3**(2): p. e9.
7. *A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum*. Bull World Health Organ, 1980. **58**(4): p. 585-91.
8. Drake JW, *Rates of spontaneous mutation among RNA viruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(9): p. 4171-5.
9. Rebelo de Andrade H, *Ortomixovírus*, em *Microbiologia Médica*, H. Barroso, A. Meliço-Silvestre, e N. Taveira, Editors. 2014, Lidel. p. 148-161.
10. Shaman J, Kohn M, *Absolute humidity modulates influenza survival, transmission, and seasonality*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(9): p. 3243-8.
11. *Boletim de Vigilância Epidemiológica da Gripe - Semana 20/2017*. 2017, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge I.P.: <http://www.insa.min-saude.pt/category/informacao-e-cultura-cientifica/publicacoes/atividade-gripal/>.
12. Guiomar R, Pechirra P, Cristóvão P, Costa I, Conde P, *et al.*, *Programa Nacional de Vigilância da Gripe: relatório da época 2015/2016*. 2016: Repositório Científico do Instituto Nacional de Saúde.
13. Guiomar R, Costa I, Cristóvão P, Pechirra P, Rodrigues AP, *et al.*, *Programa Nacional de Vigilância da Gripe: relatório da época 2014/2015*. 2015, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP: Repositório Científico do Instituto Nacional de Saúde.
14. Guiomar R, Conde P, Cristóvão P, Pechirra P, Nunes B, *Programa Nacional de Vigilância da Gripe: relatório da época 2013/2014*. 2014, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I: Repositório Científico do Instituto Nacional de Saúde.
15. Guiomar R, Conde P, Cristóvão P, Pechirra P, Nunes B, *Programa Nacional de Vigilância da Gripe: relatório da época 2012/2013*. 2013, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP: Repositório Científico do Instituto Nacional de Saúde.
16. Gonçalves P, Pechirra P, Conde P, João I, Guiomar R, *et al.*, *Programa Nacional de Vigilância da Gripe: relatório da época 2011/2012*. 2013, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP: Repositório Científico do Instituto Nacional de Saúde.
17. Gonçalves P, Pechirra P, Conde P, Guiomar R, Nunes B, *Programa Nacional de Vigilância da Gripe: relatório da época 2010/2011*. 2012, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP: Repositório Científico do Instituto Nacional de Saúde.

18. Guimar R, Nunes B, Gonçalves P, *A Gripe em Portugal nas épocas 2008/2009 e 2009/2010 - Relatório do Programa Nacional de Vigilância da Gripe*. 2010, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP: Repositório Científico do Instituto Nacional de Saúde.
19. Santos LA, Correia V, Pedro S, Alverca E, Santos MM, *et al.*, *Caracterização genética da nova variante pandémica do vírus influenza A(H1N1) 2009 em circulação em Portugal: resultados preliminares*. Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas, 2010. **6**(1): p. 7-13.
20. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y, *Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus*. Nature, 2009. **459**(7249): p. 931-9.
21. Guilligay D, Tarendeau F, Resa-Infante P, Coloma R, Crepin T, *et al.*, *The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2*. Nat Struct Mol Biol, 2008. **15**(5): p. 500-6.
22. Fodor E, *The RNA polymerase of influenza A virus: mechanisms of viral transcription and replication*. Acta Virol, 2013. **57**(2): p. 113-22.
23. Graef KM, Vreede FT, Lau YF, McCall AW, Carr SM, *et al.*, *The PB2 subunit of the influenza virus RNA polymerase affects virulence by interacting with the mitochondrial antiviral signaling protein and inhibiting expression of beta interferon*. J Virol, 2010. **84**(17): p. 8433-45.
24. Gira M, Rebelo de Andrade H, *Genetic evolution of PB1 in the zoonotic transmission of influenza A(H1) virus*. Infect Genet Evol, 2014. **27**: p. 234-43.
25. Priore SF, Kauffmann AD, Baman JR, Turner DH, *The Influenza A PB1-F2 and N40 Start Codons Are Contained within an RNA Pseudoknot*. Biochemistry, 2015. **54**(22): p. 3413-5.
26. Resa-Infante P, Jorba N, Coloma R, Ortin J, *The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function*. RNA Biol, 2011. **8**(2): p. 207-15.
27. Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, *et al.*, *A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death*. Nat Med, 2001. **7**(12): p. 1306-12.
28. Zell R, Krumbholz A, Eitner A, Krieg R, Halbhuer KJ, *et al.*, *Prevalence of PB1-F2 of influenza A viruses*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 2): p. 536-46.
29. Krumbholz A, Philipps A, Oehring H, Schwarzer K, Eitner A, *et al.*, *Current knowledge on PB1-F2 of influenza A viruses*. Med Microbiol Immunol, 2011. **200**(2): p. 69-75.
30. Wise HM, Foeglein A, Sun J, Dalton RM, Patel S, *et al.*, *A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA*. J Virol, 2009. **83**(16): p. 8021-31.
31. Dias A, Bouvier D, Crepin T, McCarthy AA, Hart DJ, *et al.*, *The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit*. Nature, 2009. **458**(7240): p. 914-8.
32. Jagger BW, Wise HM, Kash JC, Walters KA, Wills NM, *et al.*, *An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response*. Science, 2012. **337**(6091): p. 199-204.
33. Lee J, Yu H, Li Y, Ma J, Lang Y, *et al.*, *Impacts of different expressions of PA-X protein on 2009 pandemic H1N1 virus replication, pathogenicity and host immune responses*. Virology, 2017. **504**: p. 25-35.
34. Muramoto Y, Noda T, Kawakami E, Akkina R, Kawaoka Y, *Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA*. J Virol, 2013. **87**(5): p. 2455-62.

35. Chen J, Lee KH, Steinhauer DA, Stevens DJ, Skehel JJ, *et al.*, *Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation.* Cell, 1998. **95**(3): p. 409-17.
36. Portela A, Digard P, *The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication.* J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 4): p. 723-34.
37. Neumann G, Castrucci MR, Kawaoka Y, *Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein.* J Virol, 1997. **71**(12): p. 9690-700.
38. Hutchinson EC, Fodor E, *Transport of the influenza virus genome from nucleus to nucleus.* Viruses, 2013. **5**(10): p. 2424-46.
39. Air GM, *Influenza neuraminidase.* Influenza Other Respir Viruses, 2012. **6**(4): p. 245-56.
40. Elderfield RA, Koutsakos M, Frise R, Bradley K, Ashcroft J, *et al.*, *NB protein does not affect influenza B virus replication in vitro and is not required for replication in or transmission between ferrets.* J Gen Virol, 2016. **97**(3): p. 593-601.
41. Akarsu H, Burmeister WP, Petosa C, Petit I, Muller CW, *et al.*, *Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2).* EMBO J, 2003. **22**(18): p. 4646-55.
42. Bright RA, Medina MJ, Xu X, Perez-Oronoz G, Wallis TR, *et al.*, *Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern.* Lancet, 2005. **366**(9492): p. 1175-81.
43. Wise HM, Hutchinson EC, Jagger BW, Stuart AD, Kang ZH, *et al.*, *Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain.* PLoS Pathog, 2012. **8**(11): p. e1002998.
44. Mould JA, Paterson RG, Takeda M, Ohigashi Y, Venkataraman P, *et al.*, *Influenza B virus BM2 protein has ion channel activity that conducts protons across membranes.* Dev Cell, 2003. **5**(1): p. 175-84.
45. Imai M, Watanabe S, Ninomiya A, Obuchi M, Odagiri T, *Influenza B virus BM2 protein is a crucial component for incorporation of viral ribonucleoprotein complex into virions during virus assembly.* J Virol, 2004. **78**(20): p. 11007-15.
46. Hale BG, Randall RE, Ortin J, Jackson D, *The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses.* J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 10): p. 2359-76.
47. Marc D, *Influenza virus non-structural protein NS1: interferon antagonism and beyond.* J Gen Virol, 2014. **95**(Pt 12): p. 2594-611.
48. Robb NC, Smith M, Vreede FT, Fodor E, *NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome.* J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 6): p. 1398-407.
49. Samji T, *Influenza A: understanding the viral life cycle.* Yale J Biol Med, 2009. **82**(4): p. 153-9.
50. Li S, Sieben C, Ludwig K, Hofer CT, Chiantia S, *et al.*, *pH-Controlled two-step uncoating of influenza virus.* Biophys J, 2014. **106**(7): p. 1447-56.
51. Das K, Aramini JM, Ma L-C, Krug RM, Arnold E, *Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets.* Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(5): p. 530-538.
52. Gaur P, Munjhal A, Lal SK, *Influenza virus and cell signaling pathways.* Med Sci Monit, 2011. **17**(6): p. RA148-54.

53. König R, Stertz S, Zhou Y, Inoue A, Hoffmann HH, *et al.*, *Human host factors required for influenza virus replication*. *Nature*, 2010. **463**(7282): p. 813-7.
54. Krug RM, Yuan W, Noah DL, Latham AG, *Intracellular warfare between human influenza viruses and human cells: the roles of the viral NS1 protein*. *Virology*, 2003. **309**(2): p. 181-9.
55. Shapira SD, Gat-Viks I, Shum BO, Dricot A, de Grace MM, *et al.*, *A physical and regulatory map of host-influenza interactions reveals pathways in H1N1 infection*. *Cell*, 2009. **139**(7): p. 1255-67.
56. Ehrhardt C, Ludwig S, *A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway*. *Cell Microbiol*, 2009. **11**(6): p. 863-71.
57. Hale BG, Albrecht RA, Garcia-Sastre A, *Innate immune evasion strategies of influenza viruses*. *Future Microbiol*, 2010. **5**(1): p. 23-41.
58. Herold S, Ludwig S, Pleschka S, Wolff T, *Apoptosis signaling in influenza virus propagation, innate host defense, and lung injury*. *J Leukoc Biol*, 2012.
59. Lowy RJ, *Influenza virus induction of apoptosis by intrinsic and extrinsic mechanisms*. *Int Rev Immunol*, 2003. **22**(5-6): p. 425-49.
60. Takizawa T, Nakanishi Y, *Role and pathological significance of apoptosis induced by influenza virus infection*. *The Open Antimicrobial Agents Journal*, 2010. **2**: p. 22-25.
61. Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR, *Mechanisms and functions of cell death*. *Annu Rev Cell Biol*, 1991. **7**: p. 663-98.
62. Sola S, Pedro T, Ferreira H, Rodrigues CM, *Apoptose: Uma questão de vida ou de morte*, in *Biologias*. 2001, Ordem dos Biólogos: <http://arquivo.ordembilogos.pt/Publicacoes/Biologias/Apoptose -- 01Fev01.pdf>.
63. Sola S, Morgado AL, Rodrigues CM, *Death receptors and mitochondria: two prime triggers of neural apoptosis and differentiation*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1830**(1): p. 2160-6.
64. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C, *Mitochondrial membrane permeabilization in cell death*. *Physiol Rev*, 2007. **87**(1): p. 99-163.
65. Thornberry NA, Lazebnik Y, *Caspases: enemies within*. *Science*, 1998. **281**(5381): p. 1312-6.
66. Debatin KM, Krammer PH, *Death receptors in chemotherapy and cancer*. *Oncogene*, 2004. **23**(16): p. 2950-66.
67. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ, *BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis*. *Genes Dev*, 1999. **13**(15): p. 1899-911.
68. Berthelet J, Dubrez L, *Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs)*. *Cells*, 2013. **2**(1): p. 163-87.
69. Krakauer DC, Payne RJ, *The evolution of virus-induced apoptosis*. *Proc Biol Sci*, 1997. **264**(1389): p. 1757-62.
70. Shin YK, Li Y, Liu Q, Anderson DH, Babiuk LA, *et al.*, *SH3 binding motif 1 in influenza A virus NS1 protein is essential for PI3K/Akt signaling pathway activation*. *J Virol*, 2007. **81**(23): p. 12730-9.
71. Cooray S, *The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signal transduction in virus survival*. *J Gen Virol*, 2004. **85**(Pt 5): p. 1065-76.



72. Ogawara Y, Kishishita S, Obata T, Isazawa Y, Suzuki T, *et al.*, *Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21843-50.
73. Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK, *Akt, FoxO and regulation of apoptosis*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(11): p. 1978-86.
74. del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G, *Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt*. Science, 1997. **278**(5338): p. 687-9.
75. Kuo CT, Hsu MJ, Chen BC, Chen CC, Teng CM, *et al.*, *Denbinobin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells via Akt inactivation, Bad activation, and mitochondrial dysfunction*. Toxicol Lett, 2008. **177**(1): p. 48-58.
76. Gottlieb TM, Leal JF, Seger R, Taya Y, Oren M, *Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis*. Oncogene, 2002. **21**(8): p. 1299-303.
77. Luo HR, Hattori H, Hossain MA, Hester L, Huang Y, *et al.*, *Akt as a mediator of cell death*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11712-7.
78. Brunet A, Datta SR, Greenberg ME, *Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway*. Curr Opin Neurobiol, 2001. **11**(3): p. 297-305.
79. Baldwin AS, Jr., *The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 649-83.
80. Catz SD, Johnson JL, *Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer*. Oncogene, 2001. **20**(50): p. 7342-51.
81. Chen C, Edelstein LC, Gelinas C, *The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L)*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(8): p. 2687-95.
82. Turner DJ, Alaish SM, Zou T, Rao JN, Wang JY, *et al.*, *Bile salts induce resistance to apoptosis through NF-kappaB-mediated XIAP expression*. Ann Surg, 2007. **245**(3): p. 415-25.
83. Zamarin D, Garcia-Sastre A, Xiao X, Wang R, Palese P, *Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1*. PLoS Pathog, 2005. **1**(1): p. e4.
84. Zamarin D, Ortigoza MB, Palese P, *Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice*. J Virol, 2006. **80**(16): p. 7976-83.
85. Varga ZT, Palese P, *The influenza A virus protein PB1-F2: killing two birds with one stone? Virulence*, 2011. **2**(6): p. 542-6.
86. Bradel-Tretheway BG, Mattiaccio JL, Krasnoselsky A, Stevenson C, Purdy D, *et al.*, *Comprehensive proteomic analysis of influenza virus polymerase complex reveals a novel association with mitochondrial proteins and RNA polymerase accessory factors*. J Virol, 2011. **85**(17): p. 8569-81.
87. Tripathi S, Batra J, Cao W, Sharma K, Patel JR, *et al.*, *Influenza A virus nucleoprotein induces apoptosis in human airway epithelial cells: implications of a novel interaction between nucleoprotein and host protein Clusterin*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e562.
88. Sharma K, Tripathi S, Ranjan P, Kumar P, Garten R, *et al.*, *Influenza A virus nucleoprotein exploits Hsp40 to inhibit PKR activation*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20215.
89. Mayank AK, Sharma S, Nailwal H, Lal SK, *Nucleoprotein of influenza A virus negatively impacts antiapoptotic protein API5 to enhance E2F1-dependent apoptosis and virus replication*. Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e2018.

90. Morris SJ, Price GE, Barnett JM, Hiscox SA, Smith H, *et al.*, *Role of neuraminidase in influenza virus-induced apoptosis*. J Gen Virol, 1999. **80** ( Pt 1): p. 137-46.
91. Gaur P, Ranjan P, Sharma S, Patel JR, Bowzard JB, *et al.*, *Influenza A virus neuraminidase protein enhances cell survival through interaction with carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) protein*. J Biol Chem, 2012. **287**(18): p. 15109-17.
92. Ohyama K, Nishina M, Yuan B, Bessho T, Yamakawa T, *Apoptosis induced by influenza virus-hemagglutinin stimulation may be related to fluctuation of cellular oxidative condition*. Biol Pharm Bull, 2003. **26**(2): p. 141-7.
93. Mohsin MA, Morris SJ, Smith H, Sweet C, *Correlation between levels of apoptosis, levels of infection and haemagglutinin receptor binding interaction of various subtypes of influenza virus: does the viral neuraminidase have a role in these associations*. Virus Res, 2002. **85**(2): p. 123-31.
94. Halder UC, Bagchi P, Chattopadhyay S, Dutta D, Chawla-Sarkar M, *Cell death regulation during influenza A virus infection by matrix (M1) protein: a model of viral control over the cellular survival pathway*. Cell Death Dis, 2011. **2**: p. e197.
95. Gannage M, Dormann D, Albrecht R, Dengjel J, Torossi T, *et al.*, *Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes*. Cell Host Microbe, 2009. **6**(4): p. 367-80.
96. Rossman JS, Lamb RA, *Autophagy, apoptosis, and the influenza virus M2 protein*. Cell Host Microbe, 2009. **6**(4): p. 299-300.
97. Hinshaw VS, Olsen CW, Dybdahl-Sissoko N, Evans D, *Apoptosis: a mechanism of cell killing by influenza A and B viruses*. J Virol, 1994. **68**(6): p. 3667-73.
98. Froes F, Diniz A, *A year and two months of 2009 influenza pandemic*. Rev Port Pneumol, 2010. **16**(6): p. 867-9.
99. WHO Collaborating Centre for influenza at CDC Atlanta USA. *Sequencing primers and protocol*. 2009 12-05-2009 [citado a 2nd January 2012]; Disponível em: [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/sequencing\\_primers/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/sequencing_primers/en/).
100. Bogner P, Capua I, Lipman DJ, Cox NJ, others, *A global initiative on sharing avian flu data*. Nature, 2006. **442**(7106): p. 981-981.
101. Bao Y, Bolotov P, Dernovoy D, Kiryutin B, Zaslavsky L, *et al.*, *The influenza virus resource at the National Center for Biotechnology Information*. J Virol, 2008. **82**(2): p. 596-601.
102. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S, *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. Mol Biol Evol, 2007. **24**(8): p. 1596-9.
103. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, *et al.*, *Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans*. Science, 2009. **325**(5937): p. 197-201.
104. Kilander A, Rykkvin R, Dudman SG, Hungnes O, *Observed association between the HA1 mutation D222G in the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus and severe clinical outcome, Norway 2009-2010*. Euro Surveill, 2010. **15**(9).
105. Santos LA, Correia V, Gíria M, Pedro S, Santos MA, *et al.*, *Genetic and antiviral drug susceptibility profiles of pandemic A(H1N1)v influenza virus circulating in Portugal*. Influenza and Other Respiratory Viruses, 2011. **5**(Suppl. 1): p. 294-300.

106. Igarashi M, Ito K, Yoshida R, Tomabechi D, Kida H, *et al.*, *Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8553.
107. Correia V, Santos LA, Gira M, Almeida-Santos MM, Rebelo-de-Andrade H, *Influenza A(H1N1)pdm09 resistance and cross-decreased susceptibility to oseltamivir and zanamivir antiviral drugs*. J Med Virol, 2015. **87**(1): p. 45-56.
108. Gira MT, Rebelo de Andrade H, Santos LA, Correia VM, Pedro SV, *et al.*, *Genomic signatures and antiviral drug susceptibility profile of A(H1N1)pdm09*. J Clin Virol, 2012. **53**(2): p. 140-4.
109. Li Y, Anderson DH, Liu Q, Zhou Y, *Mechanism of influenza A virus NS1 protein interaction with the p85beta, but not the p85alpha, subunit of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and up-regulation of PI3K activity*. J Biol Chem, 2008. **283**(34): p. 23397-409.
110. Nelson M, Spiro D, Wentworth D, Beck E, Fan J, *et al.*, *The early diversification of influenza A/H1N1pdm*. PLoS Curr, 2009. **1**: p. RRN1126.
111. Shi WX, Cui SJ, Lu GL, Huang F, Qian HK, *et al.*, *[Analysis on the whole genome of the influenza H1N1 virus of the mild and severe cases in Beijing in 2009]*. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi, 2013. **47**(5): p. 420-6.
112. Mukherjee A, Nayak MK, Dutta S, Panda S, Satpathi BR, *et al.*, *Genetic Characterization of Circulating 2015 A(H1N1)pdm09 Influenza Viruses from Eastern India*. PLoS One, 2016. **11**(12): p. e0168464.
113. Dankar SK, Wang S, Ping J, Forbes NE, Keleta L, *et al.*, *Influenza A virus NS1 gene mutations F103L and M106I increase replication and virulence*. Virol J, 2011. **8**: p. 13.
114. Kochs G, Garcia-Sastre A, Martinez-Sobrido L, *Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein*. J Virol, 2007. **81**(13): p. 7011-21.
115. WHO. *Recommendations for Influenza Vaccine Composition - Northern hemisphere: 2009-2010*. 2009 [citado a 2017]; Disponível em: <http://www.who.int/influenza/vaccines/vaccinerecommendations1/en/index1.html>.
116. Network WGIS, 2.C *Virus isolation in cell culture*, em *Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza*, W.H. Organization, Editor. 2011, World Health Organization: Switzerland. p. 35-39.
117. Matrosovich M, Matrosovich T, Carr J, Roberts NA, Klenk HD, *Overexpression of the alpha-2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors*. J Virol, 2003. **77**(15): p. 8418-25.
118. Oh DY, Barr IG, Mosse JA, Laurie KL, *MDCK-SIAT1 cells show improved isolation rates for recent human influenza viruses compared to conventional MDCK cells*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(7): p. 2189-94.
119. Hoffmann E, Mahmood K, Yang CF, Webster RG, Greenberg HB, *et al.*, *Rescue of influenza B virus from eight plasmids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(17): p. 11411-6.
120. Cooper PD, *The plaque assay of animal viruses*. Adv Virus Res, 1961. **8**: p. 319-78.
121. Matrosovich M, Matrosovich T, Garten W, Klenk HD, *New low-viscosity overlay medium for viral plaque assays*. Virol J, 2006. **3**: p. 63.
122. Reed LJ, Muench H, *A simple method of estimating fifty per cent endpoints*. Am. J. Hyg. (Lond.), 1938. **27**(3): p. 493-497.

123. Paul Glezen W, Schmier JK, Kuehn CM, Ryan KJ, Oxford J, *The burden of influenza B: a structured literature review*. Am J Public Health, 2013. **103**(3): p. e43-51.
124. Santos LA, Sola S, Rodrigues CM, Rebelo-de-Andrade H, *Distinct kinetics and pathways of apoptosis in influenza A and B virus infection*. Virus Res, 2015. **205**: p. 33-40.
125. Madrid LV, Mayo MW, Reuther JY, Baldwin AS, Jr., *Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 18934-40.
126. Thomas KW, Monick MM, Staber JM, Yarovinsky T, Carter AB, et al., *Respiratory syncytial virus inhibits apoptosis and induces NF-kappa B activity through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway*. J Biol Chem, 2002. **277**(1): p. 492-501.
127. Mayo LD, Donner DB, *A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11598-603.
128. Ludwig S, Planz O, *Influenza viruses and the NF-kappaB signaling pathway - towards a novel concept of antiviral therapy*. Biol Chem, 2008. **389**(10): p. 1307-12.
129. Harris SL, Levine AJ, *The p53 pathway: positive and negative feedback loops*. Oncogene, 2005. **24**(17): p. 2899-908.
130. Huang DC, Strasser A, *BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death*. Cell, 2000. **103**(6): p. 839-42.
131. Ehrhardt C, Wolff T, Pleschka S, Planz O, Beermann W, et al., *Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses*. J Virol, 2007. **81**(7): p. 3058-67.
132. Jia D, Rahbar R, Chan RW, Lee SM, Chan MC, et al., *Influenza virus non-structural protein 1 (NS1) disrupts interferon signaling*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e13927.
133. Wang X, Li M, Zheng H, Muster T, Palese P, et al., *Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon*. J Virol, 2000. **74**(24): p. 11566-73.
134. El-Sayed I, Bassiouny K, Nokaly A, Abdelghani AS, Roshdy W, *Influenza A Virus and Influenza B Virus Can Induce Apoptosis via Intrinsic or Extrinsic Pathways and Also via NF-kappaB in a Time and Dose Dependent Manner*. Biochem Res Int, 2016. **2016**: p. 1738237.
135. Zhou H, Li XM, Meinkoth J, Pittman RN, *Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level*. J Cell Biol, 2000. **151**(3): p. 483-94.
136. Yuan W, Aramini JM, Montelione GT, Krug RM, *Structural basis for ubiquitin-like ISG 15 protein binding to the NS1 protein of influenza B virus: a protein-protein interaction function that is not shared by the corresponding N-terminal domain of the NS1 protein of influenza A virus*. Virology, 2002. **304**(2): p. 291-301.
137. Ehrhardt C, Wolff T, Ludwig S, *Activation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling by the nonstructural NS1 protein is not conserved among type A and B influenza viruses*. J Virol, 2007. **81**(21): p. 12097-100.
138. Zhirnov OP, Ksenofontov AL, Kuzmina SG, Klenk HD, *Interaction of influenza A virus M1 matrix protein with caspases*. Biochemistry (Mosc), 2002. **67**(5): p. 534-9.

139. Nailwal H, Sharma S, Mayank AK, Lal SK, *The nucleoprotein of influenza A virus induces p53 signaling and apoptosis via attenuation of host ubiquitin ligase RNF43*. Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1768.

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

## **8 Anexos**

Esta página foi intencionalmente deixada em branco



## ANEXO A

Tabela com os *accession numbers* das sequências retiradas da base de dados *GISAID* utilizadas para otimização dos *primers* utilizados na estratégia de sequenciação dos segmentos genéticos das estirpes da variante pandêmica A(H1N1)pdm09.

PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	NS	M
CY040644	CY040040	CY040722	CY039527	CY040801	FJ966956	CY040019	CY040614
CY040870	CY040635	CY040872	FJ966082	CY040873	FJ966969	CY040866	CY040883
CY040877	CY040748	CY040879	FJ966952	CY041125	FJ966973	CY040884	CY041187
CY041065	CY040878	CY041143	FJ966959	CY041753	FJ969517	CY041553	CY041823
CY041564	CY041176	CY041763	FJ966960	CY041969	FJ971075	CY041972	CY041971
CY041965	CY041555	CY041967	FJ966974	CY043111	FJ973552	CY043106	CY043113
CY043099	CY041958	CY043101	FJ969511	CY043119	FJ973555	CY043114	CY043244
CY043107	CY041981	CY043341	FJ971076	CY043262	FJ981614	CY044132	CY043276
CY043178	CY043185	CY044133	FJ973557	CY043335	FJ982431	CY044151	CY044158
CY043331	CY043209	CY044146	FJ981612	CY044148	FJ984335	CY044216	CY044215
CY043339	CY043332	CY044154	FJ982430	CY044156	FJ984340	CY045001	CY044958
CY044144	CY044145	CY044203	FJ984337	CY044213	FJ984344	CY045486	CY045493
CY044193	CY044883	CY045042	FJ984347	CY044984	FJ984350	CY045982	CY045498
CY044884	CY045480	CY045502	FJ984355	CY045504	FJ984357	FJ966086	FJ966085
CY045158	FJ998226	CY045937	FJ984360	CY045955	FJ984362	FJ969528	FJ973553
CY045500	FN423710	FJ966081	FJ984364	FJ966083	FJ984371	FJ982433	FJ973554
CY045943	GQ117034	FJ966977	FJ984375	FJ966961	FJ984378	FN401578	FJ981646
FJ966079	GQ132178	FJ984346	FJ984385	FJ969536	FJ984383	FN423709	FJ982432
FJ966976	GQ160813	FN423712	FJ998207	FJ985751	FJ984386	GQ131026	FN423715
FN423711	GQ166208	GQ132172	FJ998208	FJ985805	FJ984390	GQ149680	GQ117066
GQ132138	GQ166655	GQ160812	GQ117024	FN423708	FJ984953	GQ160604	GQ131025
GQ150340	GQ166754	GQ166210	GQ117032	GQ117045	FJ998214	GQ166233	GQ149625
GQ160523	GQ222419	GQ166654	GQ117040	GQ131024	FJ998215	GQ166657	GQ149690
GQ160811	GQ232026	GQ169383	GQ117043	GQ149639	GQ117022	GQ166749	GQ166164
GQ166656	GQ246617	GQ200225	GQ117051	GQ160583	GQ117028	GQ168869	GQ166660
GQ168879	GQ253490	GQ221693	GQ117056	GQ166215	GQ117036	GQ223427	GQ166751
GQ183624	GQ258464	GQ222036	GQ117059	GQ166658	GQ117042	GQ232043	GQ168883
GQ200233	GQ267837	GQ222418	GQ117062	GQ168621	GQ117048	GQ249335	GQ169384
GQ214149	GQ283486	GQ225380	GQ117067	GQ169385	GQ117053	GQ253502	GQ200207
GQ232090	GQ329098	GQ258467	GQ117079	GQ214141	GQ117058	GQ267854	GQ200216
GQ247731	GQ330651	GQ267836	GQ117082	GQ227548	GQ117064	GQ283494	GQ200236
GQ253489	GQ359764	GQ323476	GQ117091	GQ232036	GQ117071	GQ323534	GQ200600
GQ258465	GQ359772	GQ328866	GQ117097	GQ247732	GQ117077	GQ329109	GQ214139
GQ267838	GQ375893	GQ329097	GQ117100	GQ258466	GQ117081	GQ351294	GQ221697
GQ283485	GQ377049	GQ339882	GQ117103	GQ260003	GQ117094	GQ359770	GQ221807
GQ303349	GQ402319	GQ351289	GQ117112	GQ283491	GQ117099	GQ365367	GQ251038
GQ328867	GQ464406	GQ365423	GQ117116	GQ300856	GQ117102	GQ365450	GQ258461
GQ329105	GQ465748	GQ377053	GQ117119	GQ303339	GQ117105	GQ365686	GQ280271
GQ338388		GQ392020	GQ122097	GQ329095	GQ117108	GQ396554	GQ283490
GQ365425		GQ402292	GQ149634	GQ338407	GQ117114	GQ396582	GQ293446
GQ365655		GQ411902	GQ149647	GQ359761	GQ117118	GQ402270	GQ300855
GQ392019		GQ457508	GQ149654	GQ375885	GQ122096	GQ402274	GQ323449
GQ402173		GQ464407	GQ149671	GQ396589	GQ122104	GQ402286	GQ328772
GQ402185			GQ149684	GQ422376	GQ149631	GQ463204	GQ329107
GQ464405			GQ149692	GQ465718	GQ149640	GQ494351	GQ330648
GQ465663			GQ150335		GQ149644		GQ351315
			GQ150338		GQ149659		GQ360061
			GQ166661		GQ149672		GQ360066
			GQ166752		GQ149691		GQ365447
			GQ166760		GQ150333		GQ367491
					GQ150336		GQ377058
					GQ166659		GQ396522
					GQ166750		GQ396553
					GQ166759		GQ402216
							GQ402218
							GQ457477
							GQ463203
							GQ464410
							GQ465687
							GQ485662
							GQ494352
Total	46	38	43	50	45	54	61

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

## ANEXO B

Tabela com os *accession numbers* das sequências retiradas da base de dados *NCBI Influenza Virus Resource* utilizadas na construção das árvores representadas na **Figura 9**.

PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	NS	MP
AB473548	AB268552	AB268553	AF455680	AB268554	AB302788	AB268556	AB268555
AF455736	AF455728	AF455720	AY619961	AF455704	AJ518092	AF455712	AJ293925
AJ293920	AJ293921	AJ293922	CY010580	AJ293924	AY619960	AJ293941	AY619959
AY619954	AY619955	AY619956	CY024925	AY619958	CY000451	AY619973	AY619976
AY619970	AY619971	AY619972	CY026139	AY619974	CY010582	CY010584	CY010581
CY010587	CY000456	CY010585	CY031336	CY010583	CY024927	CY024929	CY024926
CY024932	CY003070	CY024930	CY038007	CY024928	CY026141	CY026143	CY026140
CY026146	CY010586	CY026144	CY043147	CY026142	CY030233	CY032668	CY031337
CY032661	CY024931	CY032663	CY043334	CY032665	CY032666	CY033626	CY031800
CY033629	CY026145	CY033627	CY044204	CY034119	CY037938	CY034120	CY032667
CY034123	CY027161	CY034121	CY045503	CY038008	CY043149	CY038011	CY038010
CY038004	CY032662	CY038006	CY045970	CY043150	CY043336	CY043151	CY043148
CY043154	CY033628	CY043152	CY046859	CY043335	CY044206	CY043338	CY043337
CY043331	CY034122	CY043333	DQ889689	CY044205	CY045505	CY044208	CY044207
CY044201	CY038005	CY044203	EU026014	CY045504	CY045972	CY045507	CY045506
CY045500	CY043153	CY045502	EU124177	CY045971	CY046861	CY045974	CY045973
CY045967	CY043332	CY045969	EU604689	CY046862	DQ889687	CY046863	CY046860
CY046866	CY044202	CY046864	FJ969540	CY047402	EF101756	DQ280208	DQ280210
DQ280205	CY045501	DQ280207	GQ149634	DQ280209	EU604690	DQ889685	DQ889688
DQ889682	CY045968	DQ889684	GQ166661	DQ889686	FJ432756	EU604696	EU604695
FJ432761	CY046865	EU604693	GQ392029	EU604694	FJ984386	FJ969528	FJ432755
FJ969530	DQ889683	FJ432759		FJ432757	GQ149631	GQ149635	FJ966975
GQ149632	EU604692	FJ969529		FJ969536	GQ166659	GQ166657	GQ149638
GQ166656	FJ432760	GQ149636		GQ149637	GQ392031	GQ392033	GQ166660
GQ392026	FJ969531	GQ392028		GQ166658			GQ392032
	GQ149633	GQ463199		GQ392030			
	GQ166655						
	GQ392027						

Esta página foi intencionalmente deixada em branco

Mapa e sequência do plasmídeo bidireccional de expressão *pCIPollSapIT*

